

FRANCISNEY PINTO DO NASCIMENTO

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA INOSINA EM
CAMUNDONGOS: PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES
 A_1 E A_{2A}**

FLORIANÓPOLIS – SC

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA INOSINA EM
CAMUNDONGOS: PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES
 A_1 E A_{2A}**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Adair
Roberto Soares dos Santos

FLORIANÓPOLIS – SC

2008

Dedico aos meus pais, Valdelírio e Maria do Carmo, que não fizeram outra coisa na vida além de trabalhar pela educação dos seus filhos.

Um Pito

Olha guri, repare o que estás fazendo
depois que fores é difícil de voltar
Passei-te um pito e continuas remoendo
teu sonho moço deste rancho abandonar

Olha guri, lá no povo é diferente
e certamente faltará o que tens aqui
Eu só te peço, não esqueças de tua gente
de vez em quando mande uma carta, guri

Se vais embora, por favor não te detenhas
siga em frente, não olhes para trás
que assim não vais ver a lágrima insistente
que molha o rosto do teu velho, meu rapaz

Olha guri, pra tua mãe cabelos brancos
E pra este velho que te fala sem gritar
Pesa teus planos, eu quero que sejas franco
se acaso fores, pegue o zaino pra enfrenar

Olha guri, leva uns cobres de reserva
pega uma erva pra cevar teu chimarrão
e leva um charque que é pra ver se tu conservas
uma pontinha de amor por este chão.

Nenito Sarturi, Cláudio Patias e Nelcy Vargas

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente por ter me privilegiado proporcionando-me tantas oportunidades enquanto outros nunca as tiveram. Em segundo lugar, agradeço por ter colocado ao meu lado tantas pessoas especiais, as quais agradeço em seguida.

A meu pai, o professor Valdelírio, que foi meu primeiro mestre, ensinando-me a ler, escrever, somar e multiplicar em um pequeno quadro negro na varanda de casa, ainda antes da escola. Que me ensinou ao seu jeito rígido, que todos devemos ser responsáveis e cumpridores de nossas obrigações. A todo apoio que me deu durante todos estes anos de estudos longe de casa, que nos momentos mais difíceis, me falava para “largar mão de frescura”, mostrando-me que todo problema era insignificante se encarado sem medo.

À minha mãezinha, Maria, pequenina no tamanho, mas gigante na definição da palavra MÃE. Companheira, aconselhadora, carinhosa, protetora, humana. Não me ensinou a cozinhar, mas me ensinou a compaixão, a alegria, e a sonhar. Mãe, que nos momentos difíceis chorou junto comigo, e nos momentos felizes comigo sorriu e realizou-se.

Ao professor Adair, meu orientador, por todos os ensinamentos passados ao longo desses anos. Pela sua qualidade de não escolher alunos pelo seu currículo ou experiência, mas pela vontade e coragem de aprender a fazer aquilo que nunca fizeram, assim eu entrei no seu laboratório. Pela extrema dedicação à ciência e por buscar sempre ajudar na medida do possível todos os alunos, tanto que seu laboratório é um autêntico coração de

mãe, sempre cabe mais um. Ao professor que também já é um grande amigo, conselheiro, sério, brincalhão, estressado e divertido. Obrigado professor!

À minha irmã, Maikiara, pela companhia, alegria e incentivo por todo este tempo.

À Denise, minha menininha, meu amor. Pelo companheirismo durante esta jornada, pelas alegrias compartilhadas, e pelas dificuldades passadas juntos. Pelo incentivo constante, por entender meus finais de semana em experimentos, por ajudar-me nos experimentos de finais de semana, e por muitas vezes preocupar-se com a minha dissertação mais que eu mesmo.

Aos meus avós, sempre tão distantes, mas sempre muito perto do meu pensamento. Que por suas vidas tão difíceis e sem oportunidades sempre me incentivaram e desejaram sorte nos estudos, sem muito entender de o porquê que eu já formado continuo estudando. E por isso mesmo, foram estímulos aos desafios. Ao Seu Arthur, à Dona Hermínia, ao Seu João Manuel (*in memoriam*) e à Dona Brandina, com muito carinho.

À “piazada” da República da Marlenne ®, meu lar durante todo o mestrado, lugar de alegria, diversão, festas, horas-felizes, cervejadas, churrascos, estudos, mas sobretudo, um lugar de grandes amigos e companheiros para toda a vida. Ao Daniel “Msn” Bocchese, Miguel “Laranjão” Carvalho, Léo “Tchô” Nuernberg, Júnior “Friends” Borba, Samuel “Eterno Calouro” Barquet e Léo “Natureba” Vardanega. VALEU PIAZADA!

À toda galera que está ou passou durante esta jornada pelo laboratório mais animado das festas da SBFTE, Vini, Soweto, Kelson Balada, Camila, Flávia, Liana, Ana Paula, Sonia, Cris Setim, Vanessa, Igã, Giselle, Cris Baggio, Maria Fernanda, Denise, Patrícia, Daniela, Letícia, Daiane, Gustavo,

Daniel , Leidiane, Morgana, Breno Janaína, Débora, Amanda, Janaína, Ana Flávia, Heyde, Gabriela, Érica, Renata, Mônica, Telga, Franciane. Vocês todos fazem do laboratório um lugar gostoso e divertido para trabalhar, pela união, companhia e respeito entre todos.

À Sonia, minha colega desde a faculdade ao laboratório, que me auxiliou em quase todos os experimentos, e contribuiu com idéias, sugestões e correções, *muchas gracias*.

Ao Vinícius, Kelson e Flávia, os “dinossauros do lab”, que me auxiliaram, ensinaram e ajudaram muito na minha chegada ao laboratório.

À Gi, que me ajudou desde antes do mestrado, estudando para a prova de seleção aos sábados, domingos e feriados, sem perder o bom-humor.

Ao Rodrigo Soweto, pela grande amizade e parceria durante esses anos de laboratório, de mestrado, de projetos e de convivência. Ao Daniel, exemplo de dedicação e amizade, portador de uma capacidade incalculável de idéias. Espero que possamos continuar trabalhando juntos por muitos anos.

À Maria Fernanda, nossa *Pós-doc*, pelas sugestões precisas para a realização deste trabalho.

Ao Allisson e ao Fábio Gaúcho, colegas de pesquisa de outros laboratórios, mas sempre presentes em nosso laboratório e parceiros pra tomar uma cerveja, afinal nem só de ciência e trabalho vive o homem.

À Marlenne, você que sempre me recebeu cheia de alegria cada vez que eu cheguei em casa, por mais que muitas vezes eu não tenha lhe dado a atenção que você merecia.

Aos amigos Zandonay, Zolda, André Cabeludo e Adriana.

À Rosana e Rúbia, por terem iniciado este trabalho.

Aos professores Jamil e Pádua, pelas conversas e ensinamentos. Como coordenadores da Pós, sempre disponíveis, acessíveis e prestativos.

À Diana, secretária da Pós em Farmacologia, sempre rápida, eficiente e carinhosa, mesmo para resolver problemas.

À Dona Wilma, secretária da Fisiologia, sempre sorrindo e bem-humorada, nossa cozinheira de bananinhas fritas, anchova e cafezinho. E ao Seu Carlos, zelador da Fisiologia, um bom e divertido papo no corredor e sempre pronto para qualquer solicitação ou serviço necessário. Quem dera todos os doutores do corredor tivessem a sua educação Seu Carlos.

Ao “Tiozinho Só Alegria” do RU, impossível não achar graça de alguma coisa ao pegar os talheres do bandeirão, por mais que o prato do dia fosse o “morcego”, o “robocop”, as “almôndegas assassinas”, ou se o glutamato tivesse feito apenas cócegas nos camundongos durante a manhã.

Aos camundongos utilizados, ferramentas de estudo e de trabalho. Meu profundo respeito.

Ao CNPq, UFSC e CAPES, pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	i
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 DOR	1
1.2 NOCICEPÇÃO	2
1.3 O NOCICEPTOR	3
1.4 CLASSIFICAÇÃO DOS NOCICEPTORES	4
1.5 MEDIADORES DA NOCICEPÇÃO	7
1.6 VIAS E A TRANSMISSÃO DA NOCICEPÇÃO	9
1.7 O SISTEMA PURINÉRGICO	10
1.8 A INOSINA	13
1.9 OS RECEPTORES DE ADENOSINA	15
2. JUSTIFICATIVA	18
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo Geral	19
3.2 Objetivos Específicos	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 ANIMAIS	20
4.2 DROGAS E REAGENTES	20
4.3 TESTES COMPORTAMENTAIS	21
4.3.1 Nocicepção induzida pelo ácido acético	21
4.3.2 Avaliação da atividade antinociceptiva da adenosina	22
4.3.3 Avaliação da atividade central	22
4.3.3.1 Efeito espinhal	22
4.3.3.2 Efeito supraespinhal	23
4.3.4 Nocicepção induzida pela formalina	24
4.3.5 Nocicepção induzida pelo glutamato	24

4.3.6 Avaliação da atividade periférica	25
4.3.7 Envolvimento das fibras C sensíveis à capsaicina	26
4.3.8 Envolvimento da proteína $G_{i/o}$ sensível à toxina pertussis	26
4.3.9 Avaliação da atividade locomotora: Teste do Campo Aberto	27
4.3.10 Envolvimento do receptor A_1	29
4.3.11 Envolvimento do receptor A_{2A}	30
4.3.12 Envolvimento do receptor A_{2B}	30
4.3.13 Envolvimento do receptor A_1	31
4.3.14 Envolvimento do receptor A_{2A}	32
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5. RESULTADOS	34
5.1 Nocicepção induzida pelo ácido acético	34
5.2 Efeito da adenosina na nocicepção induzida pelo ácido acético	36
5.3 Efeito central da inosina na nocicepção induzida pelo ácido acético	37
5.4 Nocicepção induzida pela formalina	38
5.5 Nocicepção induzida pelo glutamato	39
5.6 Efeito periférico da inosina na nocicepção induzida pelo glutamato	40
5.7 Envolvimento das fibras-C sensíveis à capsaicina	41
5.8 Envolvimento da proteína $G_{i/o}$ sensível à toxina Pertussis	42
5.9 Avaliação da atividade locomotora: Teste do Campo Aberto	43
5.10 Envolvimento sistêmico do receptor A_1	44
5.11 Envolvimento sistêmico do receptor A_{2A}	45
5.12 Envolvimento sistêmico do receptor A_{2B}	46
5.13 Envolvimento do receptor A_1	47
5.14 Envolvimento do receptor A_{2A}	48
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÃO	73
8. REFERÊNCIAS	74
9. ANEXOS	86

LISTA DE ABREVIACÕES

α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
μ	Micro
$^{\circ}\text{C}$	Graus centígrados
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μmol	Micromol
A_1	Receptor para adenosina do subtipo 1
A_2	Receptor para adenosina do subtipo 2
A_{2A}	Receptor para adenosina do subtipo 2A
A_{2B}	Receptor para adenosina do subtipo 2B
A_3	Receptor para adenosina do subtipo 3
AMH	Fibra A mecânico-calor sensível
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
ANOVA	Análise de variância
AINES	Antiinflamatórios não-esteroidais
AC	Adenilato ciclase
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior
CMH	Fibra C mecânico-calor sensível
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CEUA	Comitê de Ética para o Uso de Animais
Ca^{2+}	Cálcio
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DI_{50}	Dose inibitória de 50% do efeito
DAG	Diacylglicerol

EPM	Erro padrão da média
Fig	Figura
GPCR	Receptores acoplados a proteína G
GNDF	Fator neurotrófico derivado de células gliais
Glu	Glutamato
GABA	Ácido-gama aminobutírico
G _{i/o}	Proteína G _{i/o} subunidade α
G _s	Proteína G _s subunidade α
G _q	Proteína G _q subunidade α
G _{olf}	Proteína Golf subunidade α
IL-10	Interleucina 10
IP ₃	Trifosfato de inositol
Inib	Inibição
kPa	Quilo Pascals
K ⁺	Potássio
LPS	Lipopolissacarídeo
L5	Vértebra lombar 5
L6	Vértebra lombar 6
MIA	Fibras aferentes mecânico insensíveis
mg	Miligrama
mm	Milímetro
min	Minuto
mL	Mililitro
NA	Não aplicável
NGF	Fator de crescimento neural
NMDA	N-metil-D-aspartato
NaCl	Cloreto de sódio
Na ²⁺	Íon Sódio
NOS	Óxido nítrico sintase
P _{2X3}	Receptor purinérgico subtipo 2X3
PAG	Substância cinzenta periqueaduta
P ₁	Receptor purinérgico tipo 1
P ₂	Receptor purinérgico tipo 2

PLC	Fosfolipase C
PLD	Fosfolipase D
PKC	Proteína quinase C
PLA ₂	Fosfolipase A2
PKA	Proteína quinase A
PNP	Purina nucleosídeo fosforilase
PQN	Canais de cálcio do tipo P, Q e N
SP	Substância P
SNC	Sistema nervoso central
TrkA	Receptor para Tirosina quinase A
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
t-ACPD	Ácido (\pm)-1-aminociclopentano-trans-1,3-dicarboxílico
UDP	Difosfato de uracila
UTP	Trifosfato de uracila
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
XO	Xantina oxidase
i.c.v.	Intracerebroventricular
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
i.t.	Intratecal
s.c.	Subcutânea
v.o.	Via oral

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Mecanismos de transduções de sinais dos receptores para Adenosina	17
Tabela 2: Valores de DI_{50} e inibições calculados para a inosina nos diferentes modelos de nocicepção utilizados	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tipos de fibras nociceptivas	6
Figura 2: Metabolismo purinérgico	11
Figura 3: Esquema de tratamento dos animais na análise do mecanismo de ação sistêmico	29
Figura 4: Esquema de tratamento dos animais na análise do mecanismo de ação periférico	31
Figura 5: Efeito antinociceptivo e tempo-dependente da inosina (i.p. e v.o.) no modelo de nocicepção do ácido acético	35
Figura 6 : Efeito antinociceptivo da adenosina no modelo de nocicepção pelo ácido acético	36
Figura 7: Efeito antinociceptivo da inosina (i.t. e i.c.v.) no modelo de nocicepção induzida por ácido acético	37
Figura 8: Efeito antinociceptivo da inosina (i.p.) no modelo de nocicepção induzida por formalina	38
Figura 9: Efeito antinociceptivo da inosina (i.p.) no modelo de nocicepção induzida por glutamato	39
Figura 10: Efeito antinociceptivo periférico da inosina no modelo de nocicepção induzida por glutamato	40
Figura 11: Influência do pré-tratamento neonatal com capsaicina sobre o efeito antinociceptivo da inosina no modelo do ácido acético	41
Figura 12: Influência do pré-tratamento com toxina Pertussis sobre o efeito antinociceptivo da inosina no modelo do ácido acético	42

Figura 13: Influência da inosina (i.p.) sobre a atividade locomotora no modelo do campo aberto	43
Figura 14: Influência do pré-tratamento com 8-PT sobre o efeito antinociceptivo da inosina (i.p.) no modelo do ácido acético	44
Figura 15: Influência do pré-tratamento com ZM241385 sobre o efeito antinociceptivo da inosina (i.p.) no modelo do ácido acético	45
Figura 16: Influência do pré-tratamento com aloxazina sobre o efeito antinociceptivo da inosina (i.p.) no modelo do ácido acético	46
Figura 17: Influência do pré-tratamento com 8-PT sobre o efeito antinociceptivo da inosina (i.pl.) no modelo do glutamato	47
Figura 18: Influência do pré-tratamento com ZM241385 sobre o efeito antinociceptivo da inosina (i.pl.) no modelo do glutamato	48
Figura 19: Prováveis mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva da inosina sistemicamente	71
Figura 20: Prováveis mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva da inosina periféricamente	72

RESUMO

A inosina, um nucleosídeo endógeno, é o primeiro metabólito da adenosina, e é sintetizada através da adenosina pela adenosina desaminase. O presente estudo investigou as propriedades antinociceptivas da inosina em modelos químicos de nocicepção em animais, bem como alguns dos prováveis mecanismos de ação antinociceptiva da inosina.

A inosina (0,1-100 mg/kg), administrada pela via i.p., 30 min antes do agente algogênico, produziu inibição significativa e dependente da dose da nocicepção visceral induzida pelo ácido acético, com valor de DI_{50} de 2,0 (0,6 – 6,0) mg/kg. Quando administrada pela via oral, 60 min antes, a inosina (10-300 mg/kg) também inibiu de forma significativa e dependente da dose a nocicepção visceral induzida por ácido acético com DI_{50} de 140,0 (106 – 164) mg/kg. Além disso, a inosina administrada via i.p. (10 mg/kg) ou oral (100 mg/kg) produziu efeito antinociceptivo que permaneceu significativo até 6 e 2 horas após o tratamento dos animais, respectivamente. Além disso, a adenosina (10-300 mg/kg, i.p.) também foi capaz de reduzir de forma significativa e dependente da dose a nocicepção causada pelo ácido acético com DI_{50} de 25 mg/kg. No entanto, a inosina foi cerca de 12 vezes mais potente que a adenosina no modelo de nocicepção induzida por ácido acético. A inosina (0,01–10 µg/sítio), administrada pela via i.t. e pela via i.c.v. (0,1-10 µg/sítio), 15 min antes, produziu inibição significativa e dependente da dose da nocicepção induzida pelo ácido acético com DI_{50} de 4,2 (3,5 – 5) e 0,3 (0,2 – 0,4) µg/sítio, respectivamente. Na nocicepção induzida pela formalina, a inosina (0,1-100 mg/kg, i.p.) inibiu significativamente e de forma dependente da dose a fase inflamatória com DI_{50} de 6,4 (5,4 – 7,5) mg/kg, mas não foi capaz de inibir a fase neurogênica da nocicepção induzida pela formalina. Da mesma forma, a inosina (0,1–10 mg/kg, i.p.) inibiu de forma dependente da dose e significativamente a nocicepção induzida por glutamato com DI_{50} de 0,6 (0,4 – 0,9) mg/kg. Quando administrada perifericamente, via intraplantar, a inosina (1-100 µg/sítio) também foi capaz de reduzir de maneira dependente da dose a nocicepção causada pelo glutamato, com DI_{50} de 12,4 (6,9 - 18,3) µg/sítio. No entanto, a administração de inosina (1-100 mg/kg, i.p.), em doses que foram

efetivas nos modelos de nocicepção, não causou alteração na atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto.

No teste do ácido acético, a antinocicepção causada pela inosina (10 mg/kg, i.p.) foi revertida pelo pré-tratamento com capsaicina (50 mg/kg, s.c., no período neonatal, depletor de fibras C), toxina Pertussis (1 µg/sítio, i.t., inativador da proteína $G_{i/o}$), 8-PT (antagonista seletivo do receptor A_1 , 1 mg/kg, i.p.) e pelo ZM241385 (antagonista seletivo do receptor A_{2A} , 3 mg/kg), mas não pelo tratamento com aloxazina (antagonista seletivo do receptor A_{2B} , 0,1 mg/kg, i.p.). Perifericamente, a antinocicepção causada pela inosina (10 µg/sítio, i.pl.) co-administrada com glutamato, foi revertida significativamente pela injeção intraplantar com 8-PT (10 µg/sítio), mas não pelo ZM241385 (15 µg/sítio, i.pl.).

Em síntese, estes resultados indicam que a inosina produz antinocicepção de forma dependente da dose em vários modelos de nocicepção química através de mecanismos que envolvem interações com fibras aferentes sensíveis à capsaicina, receptores acoplados à proteína $G_{i/o}$, receptores A_1 e A_{2A} (sistemicamente) e receptor A_1 (perifericamente).

ABSTRACT

Inosine, a natural endogenous nucleoside, is the first metabolite of adenosine, and is formed from the breakdown of adenosine by adenosine deaminase. This study aimed at investigating the systemic, central and peripheral antinociceptive properties of inosine against several chemical models of pain in mice and which mechanisms would be involved in its antinociception action.

Inosine (0, 1-100 mg/kg), given by i.p. route, 30 min earlier, produced a dose-dependent inhibition of acetic acid-induced visceral pain, with mean ID_{50} value of 2.0 (0.6 – 6.0) mg/kg. Given orally, 60 min earlier, inosine (10-300 mg/kg) also produced a dose-related inhibition of the visceral pain caused by acetic acid, with mean ID_{50} value of 140 (106 – 164) mg/kg. Furthermore, inosine (10 mg/kg) when given by i.p. route, was effective until 6 hours, and when given (100 mg/kg) by p.o. route, was effective until 2 hours. Moreover, adenosine when given by i.p. route produced marked antinociception in acetic acid-induced visceral pain, with ID_{50} value of 25 (15.6 – 33.3) mg/kg. Inosine, given by i.t. route (0.01–10 μ g/site), and given by i.c.v. route (0.1-10 μ g/site), 15 min earlier, produced dose-dependent inhibition of acetic acid-induced visceral pain, with mean ID_{50} value of 4.2 (3.5 – 5.0) and 0.3 (0.2 – 0.4) μ g/site, respectively. Besides that, inosine (0.1-100 mg/kg, i.p.) caused marked inhibition of inflammatory phase of formalin-induced pain, with mean ID_{50} 6.40 (5.4 – 7.5) mg/kg value, but it did not caused inhibition of neurogenic phase. Inosine (0.01-10 mg/kg, i.p.), also caused significant and dose-dependent inhibition of glutamate-induced pain, with mean ID_{50} values of 0.60 (0.4 – 0.9) mg/kg. In addition, inosine (1-100 μ g/site) co-administered with glutamate by i.pl. route, caused significant and dose-dependent inhibition of pain, with mean ID_{50} value of 12.4 (6.9 – 18.3) μ g/site. Inosine (1-100 mg/kg, i.p.) did not change the locomotor activity of animals in open field test.

Inosine antinociception was affected by neonatal pre-treatment with capsaicin (that has depletory action on C fibers) or by treatment with Pertussis toxin (which inativates $G_{i/o}$ protein). Systemically, the antinociception caused by

inosine (10 mg/kg, i.p.) in the acetic acid test was significantly attenuated by i.p. treatment of mice with 8-PT (A_1 selective antagonist receptor, 1 mg/kg), and by ZM241385 (A_{2A} selective antagonist receptor, 3 mg/kg), but not by aloxazine (A_{2B} selective antagonist receptor, 1 mg/kg). Peripherally, the antinociception caused by inosine (10 μ g/site, i.pl.) co-administered with glutamate, was significantly attenuated by i.pl. treatment of mice with 8-PT (10 μ g/site, i.pl.) but was not affected by i.pl. treatment of mice with ZM241385 (15 μ g/site, i.pl.).

Together, these results indicate that inosine produces dose-related antinociception in several models of chemical pain through mechanisms that involve an interaction with afferents fibers capsaicine-sensitive, $G_{i/o}$ protein and A_1 and A_{2A} receptors (systemically) and A_1 receptor (peripherally).

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOR

A palavra dor inicialmente leva-nos a uma idéia negativa e desagradável. Entretanto, a dor é utilizada pelo organismo como um poderoso sistema de alerta, e tem como principal função informar sobre um perigo real ou iminente de lesão, acionando respostas adequadas de proteção até que a causa tenha sido identificada e suprimida (Wall e Melzack, 1999; para revisão ver Julius e Basbaum, 2001).

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define a dor como “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão” (Para revisão ver Loeser e Melzack, 1999). A dor pode ser classificada de várias maneiras, uma delas é de acordo com a sua duração. A dor *aguda* se dá pela ativação direta de nociceptores (estruturas especializadas na detecção de estímulos nocivos) após um estímulo nocivo capaz ou não de causar alguma lesão. Quando a dor persiste por semanas ou meses, é classificada como dor *crônica*. A dor crônica muitas vezes permanece mesmo após a recuperação da lesão. Além disso, ela caracteriza-se também pela incapacidade do organismo restabelecer suas funções fisiológicas (Para revisão ver Loeser e Melzack, 1999; Millan, 1999).

A dor também pode ser classificada quanto à sua origem. Primeiramente a dor *nociceptiva*, que ocorre devido a uma ativação excessiva de nociceptores com terminações na pele, vísceras e outros órgãos. Quando o tecido neuronal é lesionado e libera neuropeptídeos que levam a dor, tanto por estímulo

periférico ou central a dor é chamada *neurogênica*. A dor *neuropática* é a que ocorre após a lesão ou disfunção de um nervo ou grupo de nervos. A dor de origem psicológica e que não possui um fator somático identificável é denominada dor *psicogênica* (Para revisão ver Millan, 1999).

Muitas vezes, quando a dor acontece devido a uma significativa lesão tecidual, desencadeia uma série de eventos em cascata, que podem originar a inflamação. Nestes casos, normalmente ocorre uma hipersensibilização dos nociceptores e conseqüentemente um aumento da transmissão nociceptiva. Assim, ocorre a *hiperalgesia*, que é uma resposta exacerbada a um estímulo previamente nocivo, devido a uma sensibilização das terminações nervosas nociceptivas periféricas e a facilitação central da transmissão ao nível do corno dorsal e do tálamo; e a *alodínia*, que ocorre quando um estímulo previamente não-nocivo é capaz de causar dor, aproveitando-se do menor limiar necessário para disparo do nociceptor e início da transmissão nociceptiva (Para revisão ver Woolf, 1995; Haddad, 2007).

1.2 NOCICEPÇÃO

A dor sentida por humanos envolve componentes de aspectos neurais, fisiológicos, comportamentais, psicológicos e emocionais. A dor que um animal é capaz de sentir pode envolver também muitos aspectos, entretanto, apenas os mecanismos neurais e fisiológicos ainda são passíveis de mensuração. Com o objetivo de diferenciar estes dois aspectos da dor, surgiu o termo *nocicepção*. Nocicepção deriva do latim, *nocere*, que significa ferir. A nocicepção define-se então, como a parte fisiológica da dor, desprezando os aspectos emocionais e psicológicos. Dessa forma, a nocicepção torna-se passível de mensuração, em

consequência disso os modelos animais para investigação da dor, são na verdade, modelos de nocicepção (Para revisão ver Wall e Melzack, 1999; Julius e Basbaum, 2001).

1.3 O NOCICEPTOR

No início do século XX, muito antes do advento da tecnologia biomolecular e de técnicas eletrofisiológicas apuradas, Sherrington propôs a existência do *nociceptor*, um neurônio sensorial primário que seria ativado por um estímulo capaz de causar dano tecidual (Para revisão ver Julius e Basbaum, 2001). De acordo com o modelo de Sherrington, nociceptores teriam limiares ou sensibilidades características que os distinguiriam de outras fibras nervosas sensoriais. Posteriormente, estudos eletrofisiológicos mostraram de fato a existência de neurônios sensoriais primários que podem ser excitados por calor nocivo, intensa pressão ou irritantes químicos, mas não por estímulos inócuos, tais como um contato morno ou um leve toque. Assim a dor aguda pode ser definida como uma modalidade sensorial semelhante à visão ou olfato, onde um estímulo de uma certa qualidade ou intensidade é detectado por células especializadas (Para revisão ver Julius e Basbaum, 2001).

Quando um estímulo térmico, mecânico ou químico ativa neurônios sensoriais primários nociceptivos, inicia-se o processo doloroso. Os nociceptores conduzem informações nociceptivas da pele, órgãos e tecidos internos para a medula espinhal. Os corpos celulares dos neurônios aferentes primários estão localizados nos gânglios da raiz dorsal. Os neurônios do gânglio da raiz dorsal emitem projeções axonais em duas direções, para a

periferia e ao corno dorsal da medula espinhal (Para revisão ver Besson, 1999; Wall e Melzack, 1999).

1.4 CLASSIFICAÇÃO DOS NOCICEPTORES

Os nociceptores são classificados de acordo com suas características anatômicas, de velocidade de condução, diâmetro e grau de mielinização (Fig.1). As fibras de pequeno diâmetro são as que originam a maioria dos nociceptores. Neste grupo, encontram-se as fibras do tipo C e do tipo A δ que são responsáveis pela transmissão do estímulo nociceptivo sob condições fisiológicas. As fibras A δ são pouco mielinizadas e podem ser divididas em duas classes principais, onde diferenciam-se pela temperatura de ativação. As fibras A δ do tipo I são ativadas por temperaturas inferiores à 53°C, enquanto que as do tipo II são ativadas por temperaturas inferiores à 43°C. A condução da informação nociceptiva que ocorre via fibras A δ é a chamada primeira dor, e ocorre em uma velocidade entre 12 e 30 m/s (Para revisão ver Millan, 1999; Wall e Melzack, 1999; Julius e Basbaum, 2001; Jacobson e Gao, 2006).

As fibras C, que a maioria são também conhecidas como fibras polimodais por transmitirem estímulos mecânicos, térmicos e químicos, conduzem à uma velocidade muito mais lenta em relação às outras fibras nociceptivas, a chamada segunda dor, em torno de 0,5 a 2 m/s em virtude de não possuírem bainha de mielina (Pleuvry e Lauretti, 1996; para revisão ver Millan, 1999; Julius e Basbaum, 2001). Estas fibras são classificadas em dois grandes grupos. O grupo chamado peptidérgico, expressa o peptídeo neurotransmissor substância P (SP), o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e expressa receptores de tirosina quinase A (TrKA) que possuem alta afinidade ao fator de crescimento do nervo (NGF). Este grupo

envia suas terminações para regiões superficiais do corno dorsal da medula, nas lâminas I e II. O segundo grupo de fibras C expressa o receptor P_{2X3} , um subtipo de receptor iônico para ATP. Além disso, envia suas terminações nervosas quase que exclusivamente para a lâmina II, que juntamente com a lâmina I, constituem a substância gelatinosa (Para revisão ver Besson, 1999; Hunt e Mantyh, 2001; Julius e Basbaum, 2001).

Dentre as fibras de pequeno diâmetro, encontram-se também as fibras CMH e AMH, denominação que é utilizada para se referir às fibras C mecânico-calor-sensíveis (*do inglês, mechano-heat-sensitive*) e fibras A mecânico-calor-sensíveis (*do inglês, mechano-heat-sensitive*), respectivamente. Se a fibra nociceptiva responde a estímulos mecânicos e de calor, esta fibra muito provavelmente responde também à estímulos químicos, podendo então ser chamada de *fibra polimodal* (Para revisão ver Hunt e Koltzenburg, 2005).

As fibras mais grossas e com maior mielinização são as fibras A β , estas fibras transmitem informações numa velocidade em torno de 30 a 100 m/s. Elas respondem a um leve toque ou movimento, são encontradas basicamente na pele, e nos indivíduos normais não contribuem para a dor. Entretanto em alguma situação patológica, devido à uma sensibilização, elas podem contribuir para a alodínia mecânica (Para revisão ver Millan, 1999; Hunt e Mantyh, 2001; Julius e Basbaum, 2001).

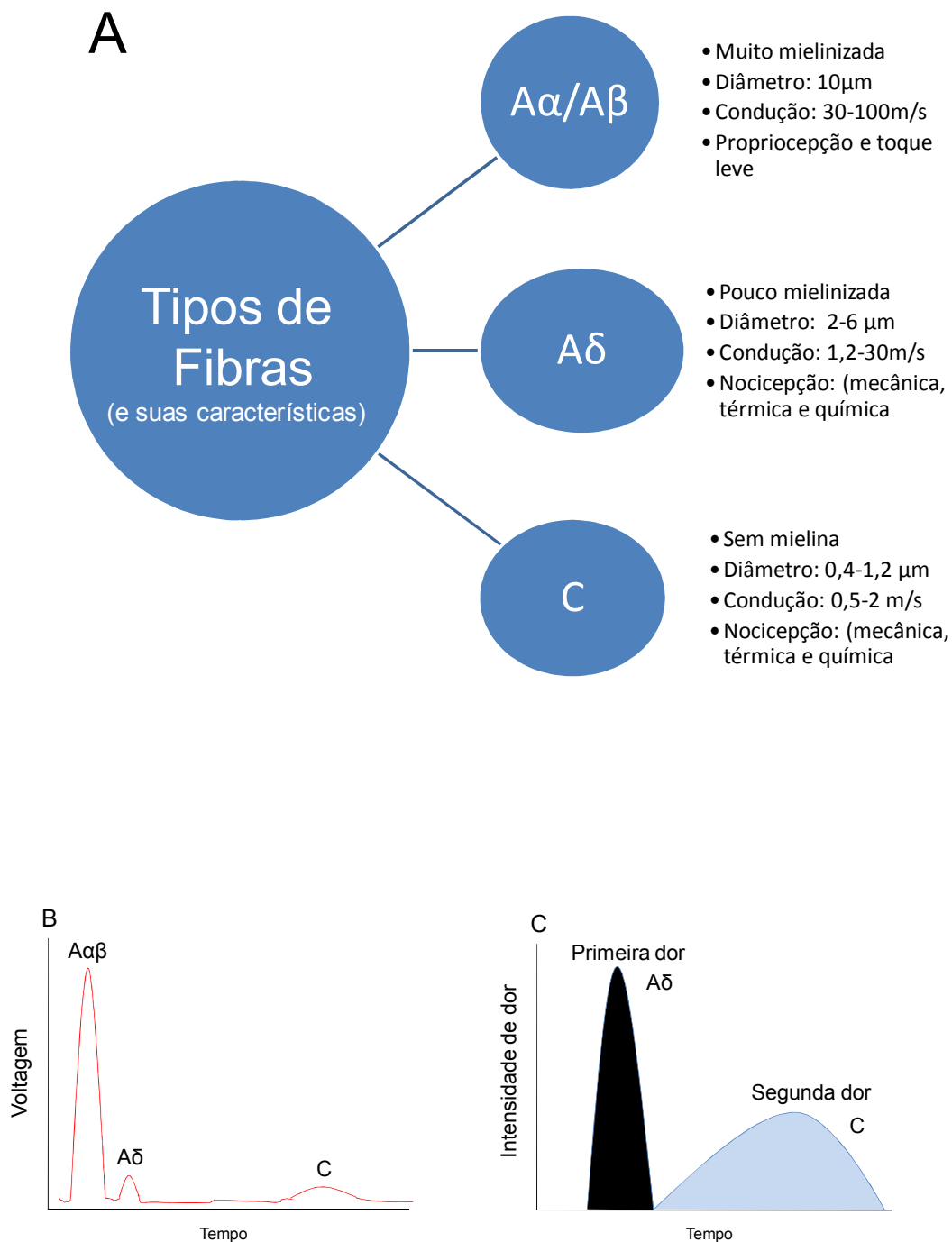


Figura 1: Tipos de fibras nociceptivas, atividade elétrica e intensidade de dor. A - Tipos de fibras nociceptivas e suas principais características. B – Descarga elétrica de fibras nociceptivas. C – Relação intensidade X tempo da dor. (Adaptado de Julius e Basbaum, 2001).

Há ainda os nociceptores de nomenclatura MIA (aférentes mecanicamente insensíveis, do inglês *mechanically insensitive afferents*),

também chamados de silenciosos ou dormentes. Estes nociceptores são uma pequena proporção das fibras aferentes, os quais normalmente possuem um limiar mecânico muito alto ou simplesmente não são responsivos a estímulos, apenas são capazes de responder após uma sensibilização por lesão tecidual. Em virtude do alto limiar de disparo ou incapacidade de resposta, encontrar o campo receptivo destas fibras é uma tarefa complicada. Através de uma técnica de aplicação de estímulos elétricos, é possível identificar estes nociceptores. Para surpresa dos pesquisadores, utilizando esta técnica que foi inicialmente descrita por Meyer e colaboradores, aproximadamente metade das fibras A δ e 30% das fibras C são MIAs, onde MIAs são definidas como fibras com limiar mecânico superior a 600 mil Pascals (kPa) ou incapazes de responder à um estímulo mecânico (Handwerker, Kilo *et al.*, 1991; Meyer, Davis *et al.*, 1991; Hunt e Koltzenburg, 2005).

1.5 MEDIADORES DA NOCICEPÇÃO

A partir da ativação de nociceptores que acontece em decorrência de estímulos térmicos, mecânicos ou de origem química, pode ocorrer a produção e liberação de vários mediadores, que modulam as transmissões nociceptivas. Após a lesão tecidual, esses mediadores podem ser liberados por neurônios sensoriais e por células não-neuronais como plaquetas, células sanguíneas, mastócitos, células endoteliais, fibroblastos, células de Schwann e até mesmo pelas próprias células inflamatórias (Besson, 1999).

O principal neurotransmissor presente em todos os nociceptores é o aminoácido excitatório glutamato. O glutamato atua principalmente em receptores ionotrópicos, do tipo NMDA, AMPA e cainato, mas também em

receptores metabotrópicos. Entretanto, muitas outras substâncias endógenas são capazes de sensibilizar os nociceptores após lesões teciduais, como CGRP, SP, ATP, prostaglandinas, neuropeptídeo Y, neurotrofinas, somatostatina, prótons, histamina, serotonina e muitos outros (Besson, 1999; Loeser e Melzack, 1999; Hunt e Mantyh, 2001; Julius e Basbaum, 2001; Kidd, Photiou *et al.*, 2004). Assim, as fibras são ativadas por canais iônicos e receptores específicos, que desencadeiam muitas vezes uma cascata de sinalização através de segundos mensageiros e outros sinalizadores intracelulares. Esta sinalização intracelular ativada sucessivas vezes pode ocasionar alterações na transcrição gênica, induzindo assim alterações na estrutura e função destes neurônios sensoriais. Estas alterações resultam em aumento ou diminuição da expressão de canais iônicos e receptores, na produção de mediadores químicos e indução de enzimas (Kidd, Photiou *et al.*, 2004; Shibasaki, 2004; Knyihar e Csillik, 2006).

Algumas substâncias causam ativação direta dos nociceptores, como bradicinina e capsaicina, causando assim uma dor aguda. Outros mediadores inflamatórios como prostaglandinas e serotonina produzem dor por sensibilizar os nociceptores, diminuindo o limiar de ativação. A excitabilidade anormal causada por inflamação ou lesão neuronal pode ocorrer pela ativação de proteínas quinases intracelulares, por exemplo, ou até indiretamente pela inibição ou estimulação da síntese de outros reguladores celulares. O aparecimento de novos canais iônicos e receptores também podem ser oriundos dessas alterações intracelulares (Coggeshall e Carlton, 1997; Besson, 1999; Millan, 1999).

1.6 VIAS E A TRANSMISSÃO DA NOCICEPÇÃO

Primeiramente os impulsos nociceptivos chegam através dos aferentes primários ao corno dorsal da medula espinhal nas respectivas lâminas onde realizam conexões, com exceção dos aferentes primários localizados na cabeça e pescoço. Para simplificar e tornar mais didática a compreensão dessas conexões e terminações dos neurônios no corno dorsal da medula espinhal, este foi dividido em lâminas de I a VI. Foi considerada lâmina I a mais superficial e a lâmina VI a mais profunda. As fibras A β responsáveis por sensações mecânicas e de propriocepção terminam em lâminas mais profundas, como III, IV, V e VI. As fibras A δ que respondem a estímulos nocivos terminam nas lâminas I e V, enquanto que as fibras A δ sensíveis mecanicamente realizam conexões nas lâminas II e III. As fibras C, que são os principais nociceptores terminam nas lâminas I e II (Para revisão ver Hunt e Koltzenburg, 2005). Após isso, a informação nociceptiva se projeta do corno dorsal para o tálamo através de neurônios de segunda ordem, que constituem as vias ascendentes. Os neurônios sensoriais secundários recebem seus sinais pela liberação de glutamato e SP dos aferentes primários. Além disso, este processo excitatório também depende de canais de cálcio e sódio, sendo os canais de cálcio os principais reguladores da liberação de neurotransmissores. As vias ascendentes mais importantes são a via espinotalâmica, a via trigeminal, a via espinoparabraquial e a via espinomesencefálica. A via espinotalâmica é a via ascendente mais importante da dor. Os neurônios de segunda ordem desta via, após a sinapse com os neurônios de primeira ordem no corno dorsal emitem suas projeções diretamente ao tálamo e córtex somatosensorial, onde a informação é processada. De outro lado, existem vias

descendentes da dor, que atuam no controle da percepção da dor. A principal via descendente inibitória ocorre quando a substância cinzenta periaquedutal (PAG), é estimulada. A estimulação elétrica da PAG causa uma analgesia intensa, que se dá pela transmissão sináptica no núcleo da rafe, através do neurotransmissor serotonina e dos interneurônios que inibem a transmissão da via espinotalâmica. O hipotálamo e a amígdala também são estruturas que participam da modulação descendente inibitória, além de sistemas de neurotransmissores, como o opióide, gabaérgico, glutamatérgico, canabinóides, noradrenérgico, purinérgico, entre outros (Para revisão ver Millan, 1999; Wall e Melzack, 1999; Hunt e Mantyh, 2001).

1.7 O SISTEMA PURINÉRGICO

O sistema purinérgico é um importante alvo terapêutico para a modulação farmacológica, pois está envolvido em várias funções fisiológicas, incluindo regulação do sono, comportamento locomotor, memória, cognição, neuroproteção, dor e outros (Sawynok e Reid, 1997; Ralevic e Burnstock, 1998; Dunwiddie e Masino, 2001; Blum, Hourez *et al.*, 2003; Takahashi, Pamplona *et al.*, 2008). Purinas extracelulares como a adenosina, o difosfato de adenosina (ADP), o trifosfato de adenosina (ATP), ou pirimidinas como o difosfato de uracila (UDP) e o trifosfato de uracila (UTP) são importantes moléculas sinalizadoras que medeiam diversos efeitos biológicos via receptores de superfície de membrana, chamados receptores para purinas (Para revisão ver Ralevic e Burnstock, 1998). Existem duas famílias principais de receptores de purinas, os receptores de adenosina (previamente chamados de receptores

P1), e os receptores que reconhecem primariamente ATP, ADP, UTP e UDP (receptores P2) (Para revisão ver Ralevic e Burnstock, 1998; Sawynok, 2007).

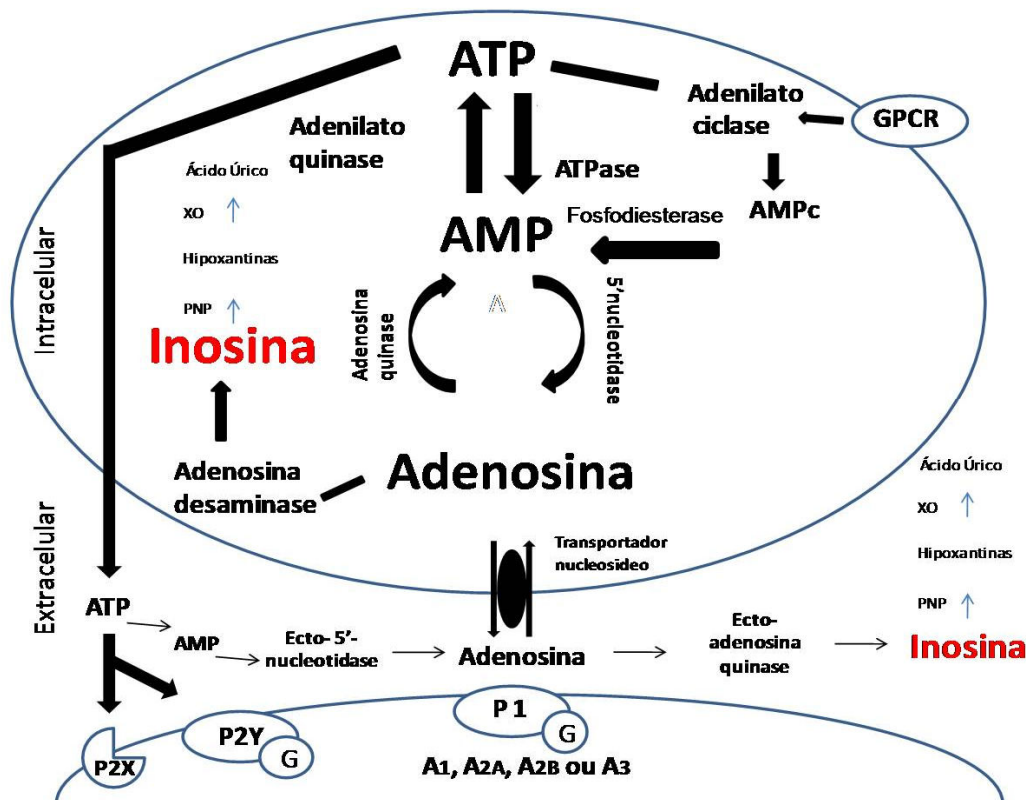


Figura. 2. Biossíntese da via purinérgica. Adaptado de Sawynok e Liu, 2003. (ATP, trifosfato de adenosina; AMP, monofosfato de adenosina; AMPc, adenosina monofosfato cíclico; A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, receptores de adenosina; GPCR, receptores acoplados à proteína G; G, proteína G; P₁, P_{2X} e P_{2Y}, receptores de purinas; PNP, purina nucleosídeo fosforilase; XO, xantina oxidase).

O sistema purinérgico tem como principal molécula precursora de vários outros metabólitos o ATP (Fig. 3). No interior da célula, ATP pode ser convertido em AMP bidirecionalmente através da *adenilato quinase* e *ATPase*. AMP pode ser convertido em adenosina através da enzima *intracelular 5-nucleotidase* e, em seguida, a adenosina pode ser transportada para o meio extracelular através de transportadores bidirecionais de nucleosídeos, podendo

ativar receptores de adenosina em células adjacentes. O ATP pode também sair para o meio extracelular, e ativar seus respectivos receptores do tipo P2. Uma parte deste ATP pode gerar adenosina via *ecto-nucleotidases*, pelo metabolismo de nucleotídeos. Existe uma família de *ecto-nucleotidases*, sendo a *ecto-5-nucleotidase* a principal enzima responsável em realizar estas reações sob condições fisiológicas (Zimmermann et al., 1998; para revisão ver Sawynok e Liu, 2003).

Adenosina ou o AMP também podem ser sintetizada a partir de adenosina monofosfato cíclico (AMPC), que é gerado dentro da célula a partir da ativação por GPCRs de superfície celular, com posterior conversão para a AMP sob ação da *fosfodiesterase* (Rosenberg e Li, 1995; Brundage e Dunwiddie, 1997). Outra fonte de adenosina no interior da célula é de S-adenosil-homocisteína, no entanto, esta via não está intimamente relacionada com o estado de energia da célula.

A conversão da adenosina para inosina, pode ocorrer nos meios intra e extracelular. Intracelularmente a inosina é formada pela quebra da adenosina pela *adenosina desaminase*. Duas enzimas que desaminam a adenosina foram clonadas, sendo que ambas possuem atividade para quebrar a adenosina em inosina, tanto intra como extracelularmente (Sala-Newby, Skladanowski *et al.*, 1999). No meio extracelular, a *ecto-adenosina desaminase* é responsável pela biossíntese da inosina a partir da adenosina. A inosina metabolizada é convertida em hipoxantinas pela ação da *purina nucleosídeo fosforilase* (PNP), que posteriormente são convertidas em ácido úrico e peróxido hidrogênio (H₂O₂) pela *xantina oxidase* (XO) (Para revisão ver (Hasko, Sitkovsky *et al.*, 2004).

Intracelularmente, a concentração intracelular de ATP é 50 vezes mais elevada do que a de AMP, e pequenas variações nas concentrações ATP podem resultar em um grande aumento na AMP. Desta forma, este sistema representa um sensor muito sensível a qualquer aumento do estresse metabólico (Latini e Pedata, 2001).

1.8 A INOSINA

A inosina, um metabólito do sistema purinérgico, como já visto, é um nucleosídeo endógeno que ocorre após a quebra da adenosina, tanto no meio intra como no meio extracelular (Barankiewicz e Cohen, 1985; Mabley, Pacher *et al.*, 2003; Sawynok e Liu, 2003). Inicialmente acreditava-se que a inosina era desprovida de efeitos biológicos. Durante algumas décadas, pensou-se que a inosina era apenas um metabólito da adenosina, incapaz de exercer algum efeito biológico. Estas conclusões baseavam-se em experimentos, que além de raros, utilizavam ínfimas doses do nucleosídeo (Aviado, 1983). A inosina, como a adenosina, é um potente vasodilatador coronário e pode impedir a vasoconstrição induzida pela noradrenalina (Juhasz-Nagy e Aviado, 1977). A inosina exerce ação direta sobre a artéria coronária causando relaxamento (Aviado, 1983), além de reduzir a resistência periférica total (Jones, Thomas *et al.*, 1977; Seesko e Zimmer, 1990).

Além dos efeitos cardiovasculares, a inosina também se mostrou imunossupressora e neuroprotetora em modelos de inflamação *in vivo*, além de estimular a produção da citocina antiinflamatória IL-10 (Gomez e Sitkovsky, 2003). Também reduz a liberação de citocinas e atua inibindo a inflamação e choque séptico (Hasko, Kuhel *et al.*, 2000; Garcia Soriano, Liaudet *et al.*, 2001;

Liaudet, Mabley *et al.*, 2001; Liaudet, Mabley *et al.*, 2002; Mabley, Pacher *et al.*, 2003). Além do mais, foi observado que a inosina causa potente inibição da liberação de citocinas inflamatórias e quimiocinas, exercendo efeitos antiinflamatórios em quadros de choque endotóxico (Garcia Soriano, Liaudet *et al.*, 2001), choque séptico (Hasko, Kuhel *et al.*, 2000) e inflamação severa de pulmão (Liaudet, Mabley *et al.*, 2001; Liaudet, Mabley *et al.*, 2002; Mabley, Pacher *et al.*, 2003). A inosina também exerce ação antiinflamatória reduzindo o número de monócitos e neutrófilos de humanos em testes *in vitro*, e diminuindo a produção de TNF- α em resposta ao tratamento com lipopolissacarídeo (LPS) (Marton, Pacher *et al.*, 2001).

Apesar da denominação de receptores de adenosina, a inosina é considerada um ativador natural dos receptores de adenosina. Jin e colaboradores em 1997 demonstraram que a inosina se liga a receptores A₃ de adenosina em mastócitos, através de ensaios *in vitro*. No mesmo trabalho (Jin, Shepherd *et al.*, 1997), foi avaliado a ligação da inosina em receptores A₁ e A_{2A} de mastócitos, e não foram encontradas evidências de que estes receptores são ativados pela inosina. Entretanto, alguns estudos realizados posteriormente demonstraram que antagonistas A₁ e A_{2A} foram capazes de reverter o efeito imunossupressor da inosina, enquanto que outro mostrou que a inosina ativou os receptores A_{2A} e A₃ e exerceu efeito imunossupressor (Hasko *et al.*, 2000; Gómez e Sitkovsky 2003). Estudos posteriores mostraram que em animais a inosina liga-se diretamente aos receptores A₁, A_{2A} e A₃. Além disso, em humanos a inosina apresenta uma afinidade muito elevada pelos receptores A₃ (Para revisão ver Hasko *et al.*, 2004).

1.9 OS RECEPTORES DE ADENOSINA

Os receptores de adenosina são todos acoplados à proteína G, e são subdivididos em 4 subtipos, A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 de acordo com suas características moleculares, farmacológicas e bioquímicas (ver tabela 1) (Ralevic e Burnstock, 1998; Ribeiro, Sebastiao *et al.*, 2002; Sawynok e Liu, 2003). Os receptores destes quatro subtipos foram clonados e caracterizados em uma variedade de espécies de mamíferos. Após evidenciar que a adenosina diminui o acúmulo de AMPc em células do sistema nervoso central (SNC), van Calker e colaboradores no final da década de 1970 descreveram os receptores A_1 e A_2 . Estes estudos mostraram que a adenosina e seus derivados, inibiam via receptor A_1 a atividade da adenilato ciclase em cultura de células de cérebro de camundongos, enquanto que via receptores A_2 , havia uma estimulação da adenilato ciclase (Van Calker, Muller *et al.*, 1978; , 1979). van Calker publicou ainda em 1979, que os efeitos da adenosina eram antagonizados por metilxantinas (família na qual se encontra a cafeína) e a ordem de potência desses antagonistas era diferente entre estes dois receptores.

Londos e colaboradores obtiveram conclusões similares um ano mais tarde, entretanto, este grupo utilizou preparações de membrana de adipócitos de ratos, hepatócitos e células de Leydig tumorais (Londos, Cooper *et al.*, 1980). Mais tarde, os receptores A_2 foram subdivididos em 2 subtipos, A_{2A} e A_{2B} . A sugestão de divisão foi originalmente proposta pela descoberta de que a estimulação da adenilato ciclase mediada por adenosina em cérebro de ratos era afetada por alta afinidade de ligação à alguns sítios como membranas estriatais, e ligações de baixa afinidade em outros sítios presentes em todo o

encéfalo (Daly, Butts-Lamb *et al.*, 1983). Posteriormente esta divisão se confirmou por estudos em humanos e por clonagem do seqüenciamento genético destes receptores.

As ações periféricas da adenosina sobre mecanismos nociceptivos são dependentes do subtipo de receptor ativado. Assim, a administração local de agonistas A_1 em roedores induz antinocicepção, enquanto que a administração de agonistas A_2 produz nocicepção quando injetado localmente. Além disso, o receptor A_3 quando ativado em nível periférico também produz efeitos algogênicos. Espinhalmente a ativação dos receptores de adenosina e seus efeitos é muito mais complexa, pois em muitos casos o mesmo receptor apresenta efeitos distintos de acordo com o modelo de nocicepção utilizado. Assim, enquanto está bem estabelecido que a ativação do receptor A_1 produz antinocicepção em nível espinhal, os receptores A_2 são alvo de muita controvérsia, pois muitos trabalhos demonstram que o receptor A_{2A} pode ter efeito antinociceptivo quando ativado, enquanto que outros autores demonstram que a ativação deste receptor leva à nocicepção (Sawynok, 1998; Lee e Yaksh, 1996; Karlsten e Gordh, 1995; Karlsten, Gordh *et al.*, 1992).

Tabela 1. Transduções intracelulares, agonistas e antagonistas dos receptores de adenosina.

Receptores				
	A ₁	A _{2A}	A _{2B}	A ₃
Adenosina (CE ₅₀ , nM)	~70	~150	~5100	~6500
Proteína G	G _i e G _o	G _s e G _{olf}	G _s e G _q	G _i e G _o
Transdução				
Adenilato Ciclase (AC)	↓	↑	↑	↓
Canais de Ca ²⁺	↓	↑(ou ↓)		
PLC	↑		↑	↑
Outros	↑K ⁺ , PLA ₂ , PLD	PKA	↑IP ₃ , MAPK	↑IP ₃ , DAG, PKC, PLD
Agonistas	CHA, CPA, R-PIA	CGS21680, DPMA	NECA, DPMA	IB-MECA
Antagonistas	8-PT, CPX, CPT, DPCPX	ZM241385, SCH58261	Aloxazina, MRS1754	MRS1191, MRS1523

Adaptado de Ralevic e Burnstock, 1998; Sawynok e Liu, 2003; Jacobson e Guao, 2006.

2. JUSTIFICATIVA

Após estas informações, a proposta deste trabalho torna-se interessante e inovadora por três pontos principais. Primeiramente, como visto, com a exceção dos sistemas cardiovascular e imune, pouco se tem estudado e analisado as funções e efeitos da inosina, havendo assim uma grande lacuna de pesquisa e perspectivas. Segundo, avaliar a capacidade da inosina em produzir antinocicepção em modelos animais de dor aguda, sendo que a literatura apresenta apenas a adenosina ou análogos de adenosina como potenciais terapêuticos da dor. E terceiro, avaliar a capacidade de a inosina ativar diretamente os receptores de adenosina em modelos de nocicepção, e especificar quais receptores sistêmica e periféricamente.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antinociceptiva da inosina através de estudos farmacológicos *in vivo*, utilizando diferentes protocolos experimentais em camundongos.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar a atividade antinociceptiva da inosina, administrada sistêmica, central e perifericamente em modelos de nocicepção induzida por ácido acético, formalina e glutamato.

Avaliar o envolvimento da proteína $G_{i/o}$ sensível à toxina Pertussis e das fibras C sensíveis à capsaicina na ação antinociceptiva da inosina.

Avaliar o envolvimento dos receptores A_1 , A_{2A} e A_{2B} na ação antinociceptiva da inosina em nível sistêmico.

Avaliar o envolvimento dos receptores A_1 e A_{2A} na ação antinociceptiva da inosina em nível periférico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss de ambos os sexos (25 a 35 g) obtidos do Biotério Central da UFSC, mantidos em temperatura controlada de 22 ± 2 °C, em ciclo de 12h claro e 12h escuro (luzes acesas às 6:00h) e com água e ração *ad libitum*. Os animais foram distribuídos homogeneamente entre os grupos e mantidos no laboratório para aclimação por pelo menos 1 hora antes da realização dos experimentos, sendo que os experimentos descritos foram realizados de acordo com as normas éticas para o estudo de dor em animais de laboratório (Zimmermann, 1983). O número de animais utilizados e os estímulos empregados foram os mínimos necessários para demonstrar os efeitos dos tratamentos. Além disso, todos os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (protocolo 23080.005145/2003-19).

4.2 DROGAS E REAGENTES

As seguintes substâncias foram utilizadas: ácido acético e formalina (Merck, Darmstadt, Alemanha), cloreto de sódio (Vetec; Rio de Janeiro, Brasil); inosina, adenosina, capsaicina, toxina Pertussis, hidrocloreto de ácido L-glutâmico, N⁶-ciclohexiladenosina (CHA), 8-fenilteofilina (8-PT), aloxazina (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) e sulfato de morfina (Cristália Ind. São

Paulo, Brasil) foram dissolvidos em salina. N⁶-[2-(3,5-Dimetoxifenil)-2(metilfenil)etiladenosina (DPMA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) e 4-(2-[7-amino-2-1,2,4}triazol-triazin-5il-aminoetil)-fenol (ZM 241385) (Tocris Cookson Inc., Ellisville, EUA) foram dissolvidos em solução salina (0,9%) com 5% de DMSO. A concentração final de DMSO não excedeu 5% e não causou qualquer efeito 'per se'.

4.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

4.3.1 Nocicepção induzida pelo ácido acético

Inicialmente foi verificado o efeito da inosina no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Este teste é descrito como um modelo típico de nocicepção inflamatória visceral e permite avaliar a atividade antinociceptiva de substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico (Appleton, Dickenson *et al.*, 1997; Le Bars, Gozariu *et al.*, 2001). A resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6%) diluído em solução salina (NaCl 0,9%). As contorções abdominais consistem na contração da musculatura abdominal juntamente com a extensão de uma das patas posteriores (Santos, Miguel *et al.*, 1999; Le Bars, Gozariu *et al.*, 2001), de acordo com o método citado descrito anteriormente (Koster, Anderson *et al.*, 1959). Grupos de animais foram pré-tratados com inosina pela via intraperitoneal (i.p.) (0,1–100 mg/kg) ou pela via oral (v.o.) (10-300 mg/kg), 30 ou 60 min antes da realização dos experimentos, respectivamente. Os grupos controles foram tratados com solução salina (10 mL/kg). Após a injeção do ácido acético, os camundongos foram colocados individualmente em funis de vidro e o número de

contorções abdominais foi cumulativamente quantificado durante um período de 20 min. A atividade antinociceptiva foi determinada pela inibição do número das contorções abdominais observadas nos animais pré-tratados sistemicamente (i.p. ou v.o.) com inosina.

Em outra série de experimentos foi avaliada a duração do efeito antinociceptivo da inosina. Para este fim, os animais receberam inosina (10 mg/kg, i.p.) e (100 mg/kg, v.o.). Transcorrido o tempo de 0,5, 1, 2, 4, 8 ou 12 h após a administração (i.p.) e 1, 2, 4, 6 ou 8 h após a administração (v.o.), divididos em grupos independentes, os animais receberam injeção de ácido acético (0,6%) e o número de contorções abdominais foi avaliada conforme descrito anteriormente.

4.3.2 Avaliação da atividade antinociceptiva da adenosina

O efeito da adenosina foi avaliado no modelo de nocicepção induzida por ácido acético (0,6%). A adenosina (1-100 mg/kg, i.p.) foi administrada aos animais e decorridos 30 min foi injetado intraperitonealmente ácido acético, imediatamente após foi avaliado o número de contorções abdominais. Desta forma, obteve-se a DI_{50} da adenosina, que pôde ser comparada com a DI_{50} da inosina.

4.3.3 Avaliação da atividade central

4.3.3.1 Efeito espinhal

Para avaliar a hipótese dos receptores espinais de adenosina estarem envolvidos na antinocicepção causada pela inosina, o nucleosídeo foi

administrado pela via intratecal (0,01-10 µg/sítio), 15 min antes da indução da nocicepção causada pela injeção de ácido acético (0,6%) conforme procedimento previamente descrito por Koster e colaboradores (1959). Os animais receberam uma injeção i.t. com um volume de 5 µL de inosina ou veículo. As injeções foram aplicadas conforme método descrito por (Hylden e Wilcox, 1980). Os animais foram contidos manualmente, e uma agulha injetora conectada por uma cânula de polipropileno à uma microseringa de 25 µL foi inserida através da pele e entre as vértebras L5 e L6 no espaço subdural. As injeções foram aplicadas durante um período de 5 s aproximadamente.

4.3.3.2 Efeito supraespinal

Para avaliar a hipótese do efeito antinociceptivo supraespinal da inosina, o nucleosídeo foi administrado pela via intracerebroventricular (0,1-10 µg/sítio), 15 min antes da indução da nocicepção por ácido acético (0,6%).

A administração de 5 µL de inosina ou veículo por via i.c.v. foi realizada em camundongos levemente anestesiados com éter, através da inserção da agulha injetora conectada por uma cânula de polipropileno em uma microseringa de 25 µL diretamente no ventrículo lateral esquerdo, com a fissura bregma como referência (1 mm lateral e 1 mm posterior ao bregma e 3 mm de profundidade)(Laursen e Belknap, 1986). Após o experimento, para validação do resultado, o animal foi sacrificado e então verificado o local exato em que a injeção foi aplicada. Assim, os resultados comportamentais obtidos de animais que sofreram a injeção em locais indevidos foram descartados.

4.3.4 Nocicepção induzida pela formalina

Para confirmação e melhor compreensão do efeito antinociceptivo da inosina, foi utilizado o teste de nocicepção induzida pela injeção i.pl. de formalina. Esse é um modelo que permite avaliar dois tipos distintos de nocicepção: a de origem neurogênica (estimulação direta dos neurônios nociceptivos) e a de origem inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios) (Hunskar e Hole, 1987; Tjolsen, Berge *et al.*, 1992). O procedimento utilizado foi semelhante ao previamente descrito por (Santos e Calixto, 1997; Santos, Miguel *et al.*, 1999). Os animais receberam 20 µL de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído) na região intraplantar da pata posterior direita. Após a injeção de formalina os animais foram colocados em funis de vidro individuais em frente a espelhos e observados durante 0-5 min (primeira fase) e 15-30 min (segunda fase) após a injeção de formalina. O tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina foi cronometrado, sendo esse tempo considerado como indicativo de nocicepção. Os animais foram tratados com inosina pela via i.p. (0,1–100 mg/kg) 30 min antes da realização dos experimentos. Os grupos controles foram tratados com solução salina (10 mL/kg).

4.3.5 Nocicepção induzida pelo glutamato

Este modelo se presta ao estudo de fármacos que atuam sobre o sistema glutamatérgico (Beirith, Santos *et al.*, 2002). Este sistema neurotransmissor é um dos mais importantes sistemas envolvidos na modulação da nocicepção e da antinocicepção tanto em nível periférico quanto central (Santos, Miguel *et al.*, 1999; Fundytus, 2001; Riedel e Neeck, 2001).

Além disso, a injeção i.pl. de glutamato induz a estimulação direta dos neurônios nociceptivos, causando assim a liberação de vários mediadores inflamatórios e neuropeptídeos também envolvidos na transmissão nociceptiva (Beirith, Santos *et al.*, 2003).

Sendo assim, esse teste foi empregado com o objetivo de analisar um possível efeito antinociceptivo da inosina na nocicepção induzida pelo glutamato. Os animais foram pré-tratados com a inosina pela via i.p. (0,01–10 mg/kg, 30 min antes), os grupos controles foram tratados com solução salina (10 ml/kg). Após 30 min, os animais receberam 20 μ L de solução de glutamato neutro (10 μ mol/pata) na região intraplantar da pata posterior direita e imediatamente após foram colocados individualmente em funis de vidro. Durante os 15 min subseqüentes, foi cronometrado o tempo que o animal permaneceu lambendo e/ou mordendo a pata injetada com glutamato, tempo este que foi considerado como indicativo de nocicepção (Beirith, Santos *et al.*, 2002).

4.3.6 Avaliação da atividade periférica

Em virtude das muitas contradições e discussões acerca da localização e função dos receptores de adenosina na modulação da nocicepção, foi avaliada a participação dos receptores periféricos de adenosina na antinocicepção causada pela inosina. Assim, o nucleosídeo (1-100 μ g/sítio) foi co-administrado com glutamato neutro (10 μ mol/sítio, pH 7), sendo o volume total injetado igual a 20 μ L na região intraplantar da pata posterior direita. Imediatamente após, os animais foram observados durante 15 min, e o tempo que os animais despenderam lambendo e/ou mordendo a pata foi considerado

como resposta nociceptiva. Estes grupos foram comparados com o grupo controle, que recebeu apenas glutamato neutro (10 μ mol/sítio, pH 7) na região intraplantar da pata posterior direita num volume de 20 μ L.

4.3.7 Envolvimento das fibras C sensíveis à capsaicina

Com a finalidade de verificar a participação dos neurônios sensoriais sensíveis a capsaicina (fibras C e A δ) na ação antinociceptiva da inosina, grupos de animais foram pré-tratados no segundo dia de vida com capsaicina (50 mg/kg, s.c.) com o objetivo de induzir uma degeneração irreversível dos neurônios aferentes primários de pequeno diâmetro, especialmente das fibras C (Holzer, 1991; Beirith, Santos *et al.*, 2003). Outro grupo de animais recebeu também no 2º dia de vida, pela mesma via, o mesmo volume do veículo usado para dissolver a capsaicina (10% etanol, 10% tween 80 e 80% salina). Para a confirmação do sucesso do tratamento neonatal com capsaicina foi avaliado o número de respostas oculares (piscadas) que o animal realizou após a aplicação tópica de solução de capsaicina (10 μ g/ml), sendo considerado positivo o tratamento quando o número de piscadas foi inferior à 5, de acordo com o método anteriormente descrito (Hammond e Ruda, 1991; Ikeda, Ueno *et al.*, 2001). Dois meses após o tratamento com capsaicina, avaliou-se a ação antinociceptiva da inosina frente a nocicepção causada pelo ácido acético.

4.3.8 Envolvimento da proteína G_{i/o} sensível à toxina pertussis

Com o objetivo de evidenciar a participação da proteína G_{i/o} sensível à toxina Pertussis, substância capaz de causar uma ribosilação da subunidade

catalítica da proteína $G_{i/o}$, na ação antinociceptiva da inosina, grupos de animais foram pré-tratados com toxina Pertussis (1 μ g/sítio, i.t.) ou com salina (5 μ L/sítio, i.t.). Transcorridos 7 dias do pré-tratamento, os animais receberam inosina (10 mg/kg, i.p.), morfina (2,5 mg/kg, s.c.) ou veículo (10 mL/kg, i.p.) de acordo com o método anteriormente descrito (Santos, De Campos *et al.*, 1999). Após 30 min de tratamento dos animais com as diferentes substâncias, a resposta nociceptiva foi analisada em relação à nocicepção causada pelo ácido acético.

4.3.9 Avaliação da atividade locomotora: Teste do Campo Aberto

O teste do campo aberto foi usado para excluir a possibilidade de que a ação antinociceptiva da inosina poderia estar relacionada com efeitos inespecíficos, tanto em nível central quanto periférico, sobre a atividade locomotora dos animais. O comportamento dos animais foi verificado conforme descrito previamente por (Rodrigues, Da Silva *et al.*, 2002). O aparato consiste em uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm. O assoalho da arena é dividido em 12 quadrados iguais, e o número de cruzamentos com todas as patas (crossing), foi contado cumulativamente durante 6 min. Além disso, foi verificado também possíveis efeitos colaterais visíveis que podem ocorrer, como tremores, piloereção, convulsões, perda de tônus entre outros. Os animais foram tratados com inosina (1 - 100 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 mL/kg, i.p.) 30 min antes da realização do experimento.

ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO

De acordo com os resultados obtidos nos modelos de nocicepção anteriormente descritos, a etapa subsequente deste trabalho foi analisar alguns

dos mecanismos que poderiam estar envolvidos no efeito antinociceptivo da inosina. Desta forma, e em virtude dos receptores de adenosina possuírem diferentes localizações, mecanismos de transduções de sinais e conseqüentemente diferentes efeitos (Jacobson e Gao, 2006; Sawynok, 2007), este trabalho analisou os mecanismos antinociceptivos da inosina nos níveis sistêmico e periférico. Para este fim, foi utilizado o modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético para análise do mecanismo sistêmico, sendo que a dose da inosina utilizada para verificar a possível reversão causada por antagonistas foi de 10 mg/kg, administrada pela via i.p., 30 min antes da realização dos experimentos. Para analisar o mecanismo antinociceptivo periférico da inosina, foi utilizado o modelo de nocicepção induzida por glutamato via i.pl., sendo o glutamato (10 μ mol/sítio, tamponado) co-administrado com a inosina. Foi utilizada a dose de 100 μ g/sítio da inosina para verificar a possível reversão causada por antagonistas dos receptores de adenosina.

As doses dos fármacos utilizados foram selecionadas com base em dados da literatura (Keddie, Poucher *et al.*, 1996; Zarrindast, Matinrokh *et al.*, 2003; Kaster, Rosa *et al.*, 2004) ou então baseadas em resultados prévios do laboratório.

MECANISMO SISTÊMICO

Os experimentos foram realizados seguindo o esquema ilustrado na figura 4:

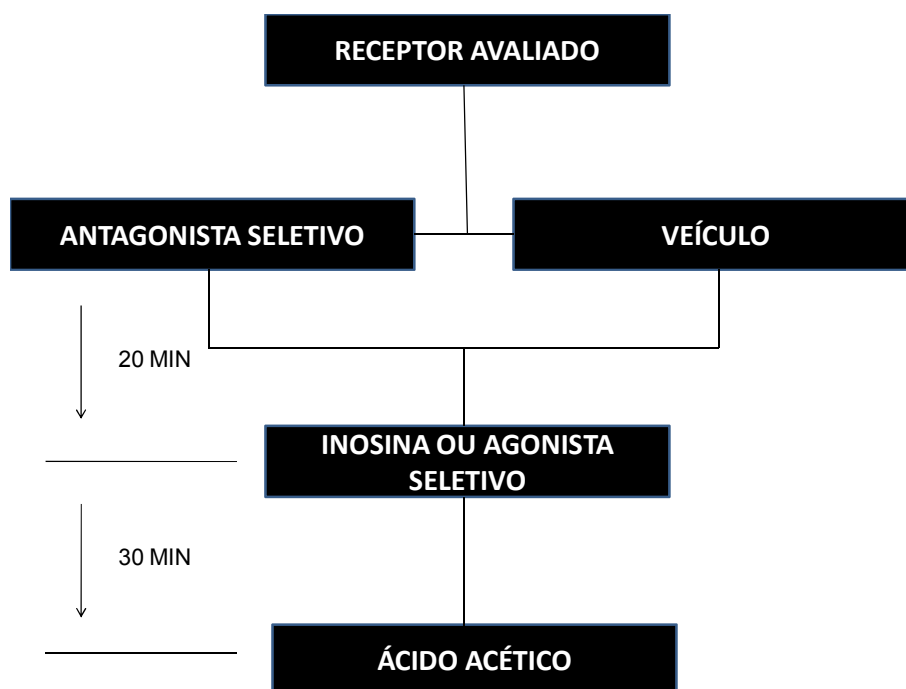


Figura 3. Esquema de tratamento dos animais na realização dos experimentos de mecanismo de ação utilizando o modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético.

Desta forma, foram realizados os seguintes experimentos:

4.3.10 Envolvimento do receptor A₁

Com o objetivo de evidenciar a participação do receptor A₁ de adenosina na ação antinociceptiva da inosina, os animais foram pré-tratados com 8-PT (antagonista seletivo do receptor A₁, 3 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.), 20 min antes da administração de inosina (10 mg/kg, i.p.), CHA (agonista seletivo do receptor A₁, 0,5 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.). Após 30 min do tratamento dos animais com inosina, CHA ou veículo, a resposta nociceptiva foi analisada em relação à nocicepção induzida por ácido acético.

4.3.11 Envolvimento do receptor A_{2A}

Com o objetivo de evidenciar a participação do receptor A_{2A} de adenosina na ação antinociceptiva da inosina, os animais foram pré-tratados com ZM-241385 (antagonista seletivo do receptor A_{2A} , 3 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) 20 min antes da administração de inosina (10 mg/kg, i.p.), DPMA (agonista misto dos receptores A_2 (A_{2A} e A_{2B}), 1 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 mL/kg, i.p.). Após 30 min do tratamento dos animais com inosina, DPMA ou veículo, a resposta nociceptiva foi analisada em relação a nocicepção induzida por ácido acético.

4.3.12 Envolvimento do receptor A_{2B}

Com o objetivo de evidenciar a participação do receptor A_{2B} de adenosina na ação antinociceptiva da inosina, os animais foram pré-tratados com aloxazina (antagonista seletivo do receptor A_{2B} , 0,1 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) 20 min antes da administração de inosina (10 mg/kg, i.p.), DPMA (agonista misto dos receptores A_2 (A_{2A} e A_{2B}), 1 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.). Após 30 min do tratamento dos animais com inosina, DPMA ou veículo, a resposta nociceptiva foi analisada em relação a nocicepção induzida por ácido acético.

MECANISMO PERIFÉRICO

Os experimentos foram realizados seguindo o esquema ilustrado na figura 5:

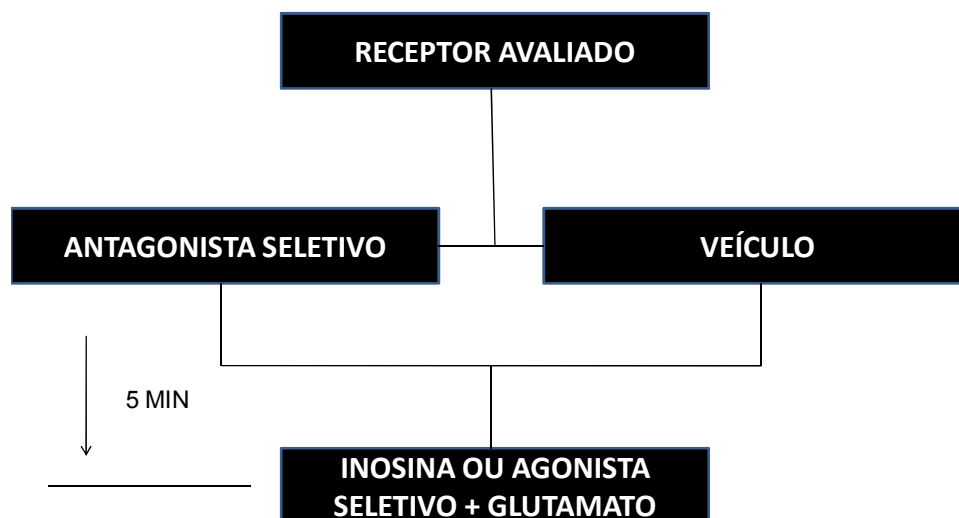


Figura 4. Esquema de tratamento dos animais na realização dos experimentos de mecanismo de ação utilizando o modelo de nocicepção induzida pelo glutamato.

4.3.13 Envolvimento do receptor A₁

Com o objetivo de evidenciar periféricamente a participação do receptor A₁ de adenosina na ação antinociceptiva da inosina, os animais foram pré-tratados com 8-PT (antagonista seletivo do receptor A₁, 1 µg/sítio, i.pl.) ou veículo (10 µl/sítio, i.pl.). Após 5 min os animais receberam inosina (100 µg/sítio, i.pl.) co-administrada com glutamato (10 µmol/sítio) ou CHA (agonista seletivo receptor A₁, 10 µg/sítio, i.pl.) co-administrado com glutamato (10 µmol/sítio) ou veículo (10 µl/sítio, i.pl.). O volume total injetado na pata do animal correspondeu a 20 µL (10 µL + 10 µL). Imediatamente após as co-administrações, os animais foram colocados sob funis de vidro para observação, e o tempo que o animal passou lambendo e/ou mordendo a pata foi considerado como resposta nociceptiva.

4.3.14 Envolvimento do receptor A_{2A}

Com o objetivo de evidenciar periféricamente a participação do receptor A_{2A} de adenosina na ação antinociceptiva da inosina, os animais foram pré-tratados com ZM241385 (antagonista seletivo do receptor A_{2A}, 15 µg/sítio, i.pl.) ou veículo (10 µL/sítio, i.pl.). Após 5 min, os animais receberam inosina (100 µg/sítio, i.pl.) co-administrada com glutamato (10 µmol/sítio) ou DPMA (agonista misto dos receptores A₂ (A_{2A} e A_{2B}), 10 µg/sítio, i.pl.) co-administrado com glutamato (10 µmol/sítio) ou veículo (10 µL/sítio, i.pl.). O volume total injetado na pata do animal correspondeu a 20 µL (10 µL + 10 µL). Imediatamente após as co-administrações, os animais foram colocados sob funis de vidro para observação, e o tempo que o animal passou lambendo e/ou mordendo a pata foi considerado como resposta nociceptiva.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), exceto os valores de DI₅₀ (doses de inosina e adenosina que reduziram as respostas nociceptivas em 50% em relação ao grupo controle), que estão apresentadas como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança em nível de 95%. As análises estatísticas entre os grupos experimentais foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida pelo teste de Newman Keuls quando necessário. Valores de *p* menores que 0,05 (*p*<0,05) foram considerados como indicativos de significância. Os valores de DI₅₀ foram obtidos através do método

de regressão linear utilizando-se o software Graph Pad Prism (2005, San Diego, CA) versão 4.03.

5. RESULTADOS

5.1 Nocicepção induzida pelo ácido acético

Os resultados apresentados nas figuras 6A e 6B mostram que a inosina, administrada tanto por via i.p. quanto por v.o., respectivamente, produziu uma inibição significativa e dependente da dose do número das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, com valores de DI₅₀ (e seus respectivos limites de confiança de 95%) de 2,0 (0,6-6,0) e 140 (106 -164) mg/kg e inibições de 86 ± 6 e $69 \pm 5\%$, respectivamente. Desta forma, a inosina foi aproximadamente 70 vezes mais potente quando administrada pela via intraperitoneal, em inibir a nocicepção induzida pelo ácido acético, do que quando administrada pela via oral. Além disso, os resultados apresentados na figura 6 C mostram que a resposta antinociceptiva da inosina foi máxima 0,5 h após sua administração pela via i.p., sendo gradativamente reduzida, contudo, se manteve significativa por até 6 h após sua administração. Quando a administração foi pela via oral, a inosina teve seu pico máximo de ação antinociceptiva em torno de 1 h após o tratamento, se mantendo até a segunda hora após a sua administração (Fig. 6D).

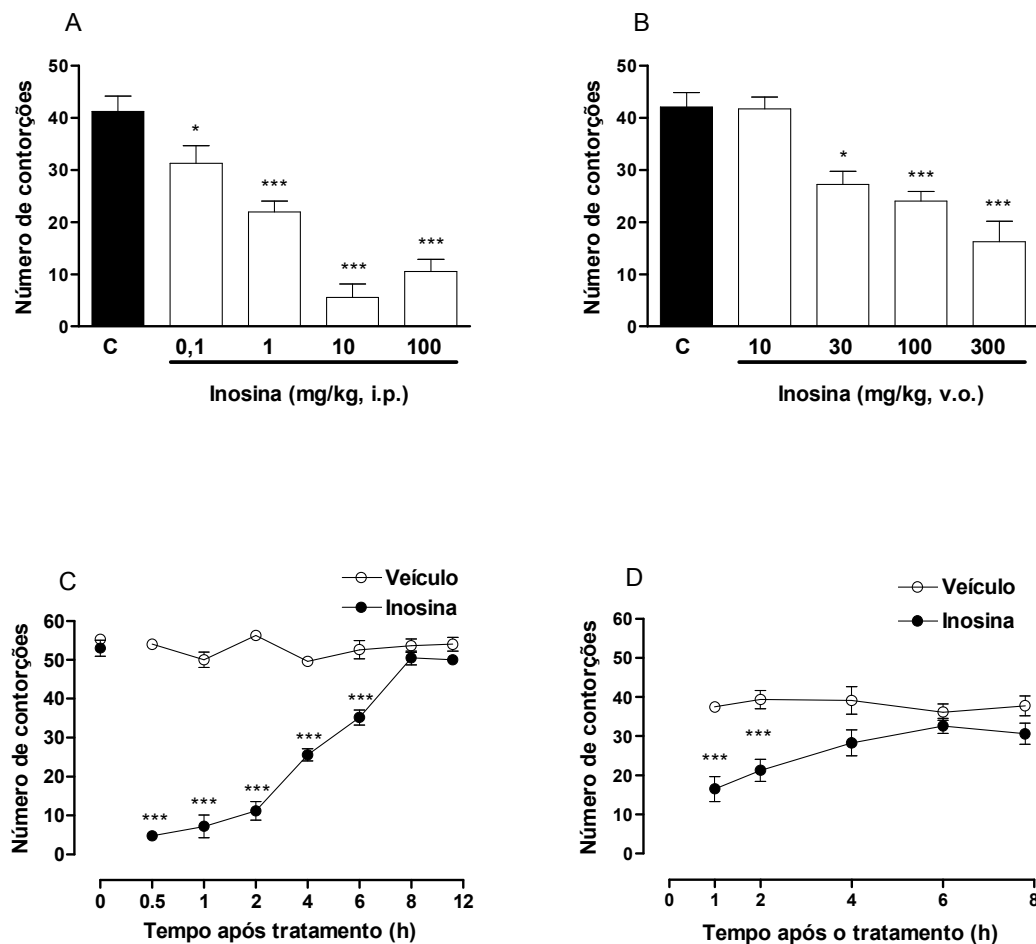


Figura 5. Efeito antinociceptivo e tempo-dependente da inosina (i.p. e v.o.) no modelo de nocicepção do ácido acético. Efeito antinociceptivo da inosina (0,1-300 mg/kg) administrada pela via i.p. (A) ou v.o. (B) na nocicepção induzida pelo ácido acético (0,6%) em camundongos. Efeito antinociceptivo tempo-dependente da inosina administrada pela via i.p. (10 mg/kg) (C) e v.o. (100 mg/kg) (D). Cada grupo representa a média de 6-12 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ difere significativamente do grupo controle (C ou veículo).

5.2 Efeito da adenosina na nocicepção induzida pelo ácido acético

Os resultados apresentados na figura 7, mostram que a adenosina administrada pela via i.p. (1-100 mg/kg) causou redução de forma dependente da dose das contorções abdominais induzida pelo ácido acético. O valor de DI_{50} foi de 25 (15,6 - 33,3) e inibição de $91 \pm 12\%$. No entanto, pode se observar que a inosina (Fig. 1A) foi cerca de 12 vezes mais potente em inibir a nocicepção causada pelo ácido acético em comparação com a adenosina.

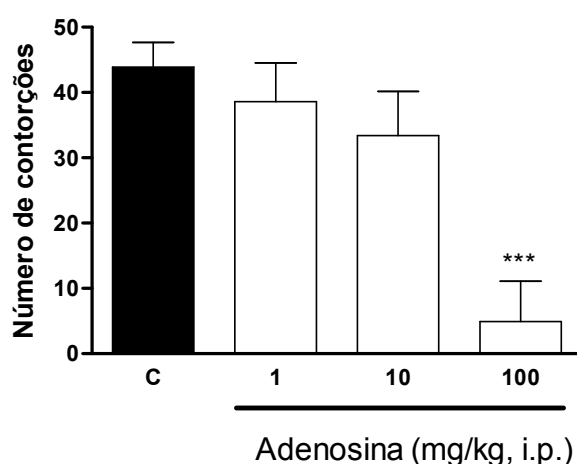


Figura 6. Efeito antinociceptivo da adenosina (i.p.) no modelo de nocicepção induzida por ácido acético. Efeito antinociceptivo da adenosina (1-100 mg/kg) administrada pela via i.p. em relação à nocicepção induzida pela injeção i.p. de ácido acético (0,6%). Cada grupo representa a média de 6-10 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. *** $P < 0,001$ difere significativamente do grupo controle (C).

5.3 Efeito central da inosina na nocicepção induzida pelo ácido acético

Os resultados apresentados na Fig. 8 (A e B) mostram que a inosina, administrada tanto pela via i.t. quanto pela via i.c.v. produziu uma inibição significativa e dependente da dose do número das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, com valores de DI_{50} (e seus respectivos limites de confiança de 95%) de 4,2 (3,5 - 5,0) e 0,3 (0,2-0,4) $\mu\text{g/sítio}$ e inibições de 72 ± 5 e $56 \pm 6\%$, respectivamente.

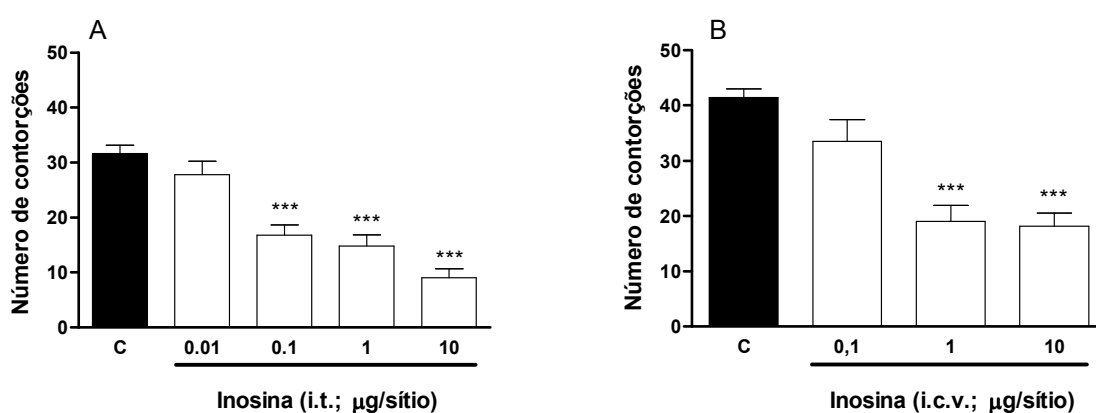


Figura 7. Efeito antinociceptivo da inosina (i.t. e i.c.v.) no modelo de nocicepção induzida por ácido acético. A inosina (0,01-10 mg/kg) foi administrada pelas vias i.t. ou i.c.v. na nocicepção induzida pelo ácido acético (0,6%). Cada grupo representa a média de 8-10 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. *** $P < 0,001$ difere significativamente do grupo controle (C).

5.4 Nociceção induzida pela formalina

A figura 9 (A e B) demonstra que a inosina (0,1-100 mg/kg, i.p.) inibiu de maneira significativa e dependente da dose apenas a nociceção de origem inflamatória (fase II) e não exerceu nenhum efeito significativo sobre a nociceção de origem neurogênica (fase I). O valor de DI_{50} para a nociceção inflamatória foi de 6,4 (5,4 - 7,5) mg/kg e inibição de $96 \pm 2\%$.

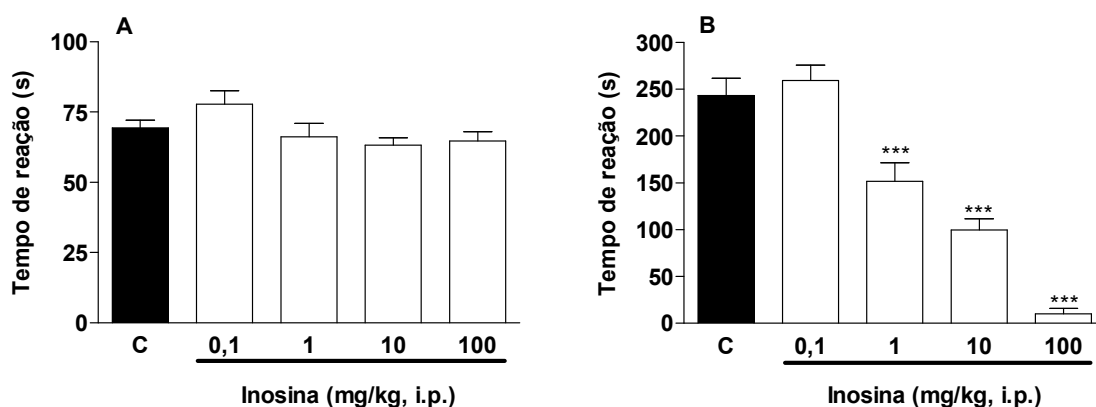


Figura 8. Efeito antinociceptivo da inosina (i.p.) no modelo de nociceção induzida por formalina. Efeito antinociceptivo da inosina (0,1-100 mg/kg) administrada pela via i.p. em relação à primeira (A) e segunda (B) fase da nociceção induzida pela formalina (2,5%). Cada grupo representa a média de 8-10 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. *** $P < 0,001$ difere significativamente dos grupos controles (C).

5.5 Nociceção induzida pelo glutamato

Os resultados apresentados na figura 10 mostram que a injeção de glutamato (i.pl.) causou uma pronunciada nociceção. A inosina quando administrada pela via i.p., causou uma inibição significativa e dependente da dose da nociceção induzida pela injeção i.pl. de glutamato, com DI_{50} de 0,60 (0,4 - 0,9) mg/kg e inibição de $69 \pm 5\%$.

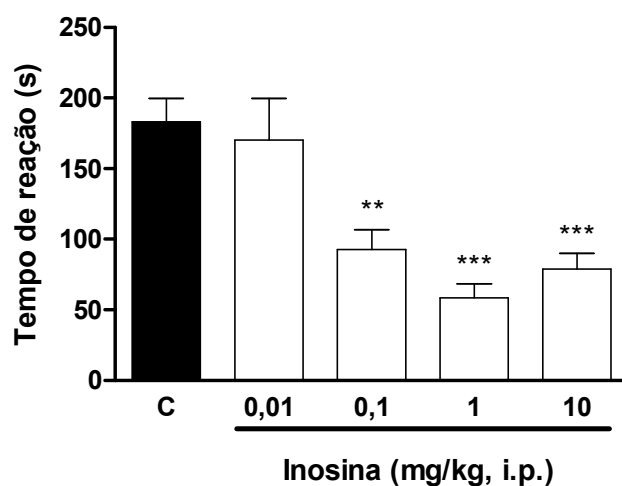


Figura 9. Efeito antinociceptivo da inosina (i.p.) no modelo de nociceção induzida por glutamato. Efeito antinociceptivo da inosina (0,01-10 mg/kg) administrada pela via i.p. em relação à nociceção induzida pela injeção i.pl. de glutamato (10 μ mol/i.pl.). Cada grupo representa a média de 6-10 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ difere significativamente do grupo controle (C).

5.6 Efeito periférico da inosina na nocicepção induzida pelo glutamato

Os resultados apresentados na figura 11 mostram que a injeção i.pl. de glutamato causou pronunciada nocicepção nos animais. A inosina, quando co-administrada com o glutamato neutro pela via i.pl., causou uma inibição significativa e dependente da dose da nocicepção induzida pela injeção i.pl. de glutamato. O valor de DI_{50} foi de 12,4 (6,9 - 18,3) $\mu\text{g/sítio}$ e inibição de $56 \pm 7\%$.

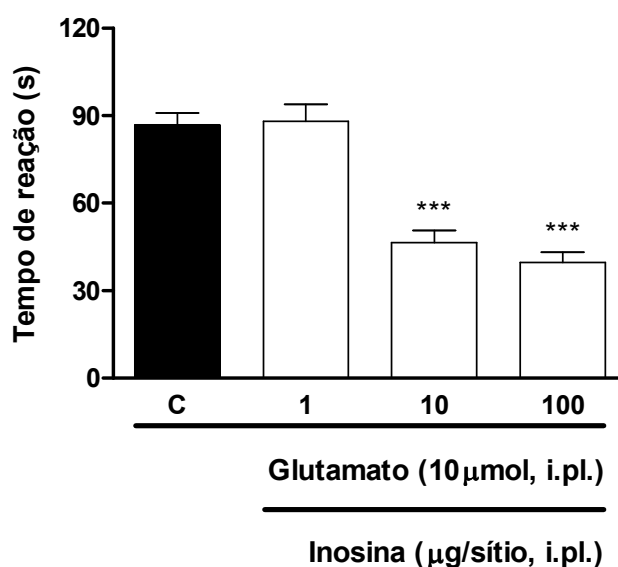


Figura 10. Efeito antinociceptivo periférico da inosina (i.pl.) no modelo de nocicepção induzida por glutamato. Efeito antinociceptivo da inosina (1-100 $\mu\text{g/sítio}$, i.pl.) co-administrada com glutamato tamponado (10 $\mu\text{mol/i.pl.}$) pela via i.pl. em relação à nocicepção induzida pela injeção i.pl. de glutamato (10 $\mu\text{mol/i.pl.}$). Cada grupo representa a média de 6-10 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. *** $P < 0,001$ difere significativamente do grupo controle (C).

5.7 Envolvimento das fibras-C sensíveis à capsaicina

O tratamento neonatal dos animais com capsaicina (50 mg/kg, s.c.), é capaz de produzir uma degeneração da maior parte das fibras sensoriais (C e A δ). O sucesso do tratamento neonatal com capsaicina foi confirmado por uma significativa redução do número de respostas oculares (piscadas) após a aplicação tópica de solução de capsaicina (10 μ g/ml).

O tratamento com capsaicina produziu parcial, mas significante inibição da nocicepção produzida pelo ácido acético. Além disso, o pré-tratamento com capsaicina, reverteu o efeito antinociceptivo da inosina (10 mg/kg, i.p.) quando comparado com o grupo tratado com salina no período neonatal (Fig. 12).

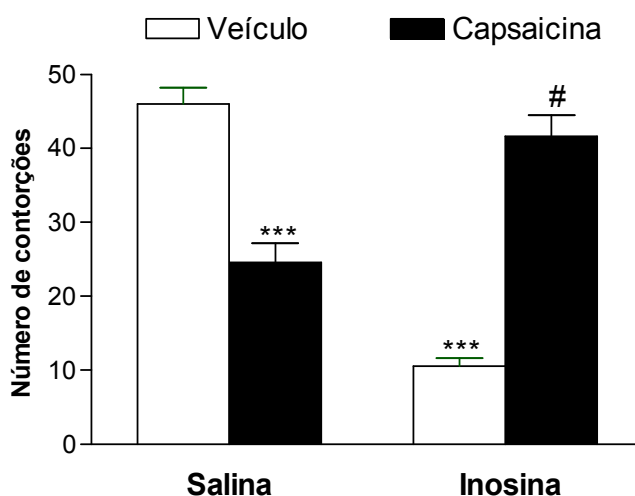


Figura 11. Influência do pré-tratamento neonatal com capsaicina (50 mg/kg, i.p.), sobre o efeito antinociceptivo da inosina (10 mg/kg, i.p.) no modelo de nocicepção induzida por ácido acético (0,6%). Cada grupo representa a média de 8-12 animais e as barras verticais indicam os E.P.M.*** P < 0,001 difere significativamente do grupo controle (veículo/salina) e #P< 0,05 difere significativamente do grupo controle (veículo/inosina).

5.8 Envolvimento da proteína $G_{i/o}$ sensível à toxina Pertussis

O pré-tratamento dos animais com toxina pertussis (1 μ g/i.t., 7 dias antes), o qual é capaz de produzir uma inativação da proteína $G_{i/o}$, não promoveu nenhuma alteração significativa na resposta dos animais que receberam injeção i.p. de ácido acético. Todavia, causou significativa reversão dos efeitos antinociceptivos causados pela inosina (10 mg/kg, i.p.) e pela morfina (2,5 mg/kg, s.c.) no modelo do ácido acético (Fig. 13).

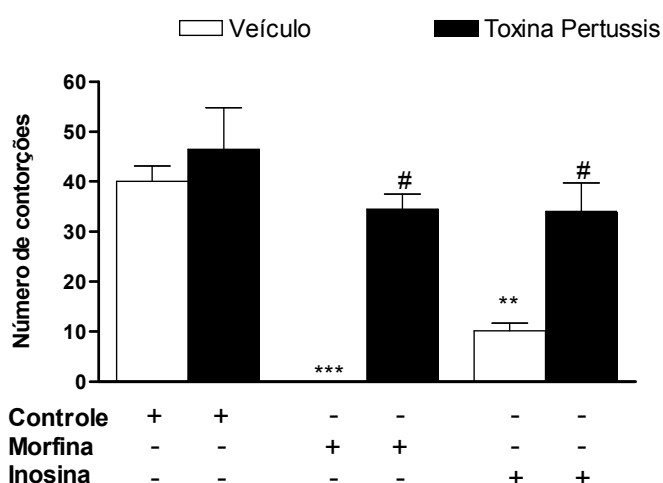


Figura 12 : Influência do pré-tratamento com toxina Pertussis sobre o efeito antinociceptivo da inosina no modelo do ácido acético. Os animais receberam toxina Pertussis (1 μ g, i.t./sítio) ou veículo (5 μ L, i.t.) e avaliou-se a influência deste pré-tratamento sobre o efeito antinociceptivo da inosina (10 mg/kg, i.p.) em relação à nocicepção induzida pelo ácido acético (0,6%). Cada grupo representa a média de 6-10 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. *P < 0,05; *** P < 0,001 difere significativamente dos grupos controle (veículo e toxina Pertussis) e # P < 0,05 difere significativamente dos grupos dos animais tratados apenas com inosina e morfina.

5.9 Avaliação da atividade locomotora: Teste do Campo Aberto

O tratamento dos animais com inosina (1-100 mg/kg, i.p.), doses nas quais apresentaram significativo efeito antinociceptivo nos modelos de nocicepção química anteriormente mostrados, não promoveu mudanças significativas sobre a atividade locomotora dos animais quando comparado com o grupo controle, avaliados no teste do campo-aberto.

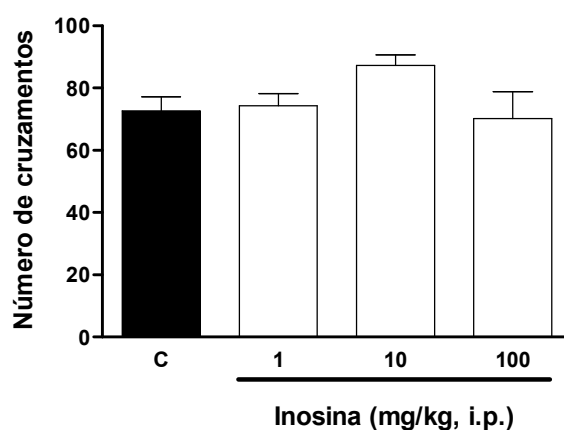


Figura 13. Influência da inosina (i.p.) sobre a atividade locomotora no modelo do campo aberto. Efeito do tratamento dos animais com inosina (1-100 mg/kg, i.p.) sobre a atividade locomotora de camundongos no teste do campo aberto. Cada grupo representa a média de 6-8 animais.

ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO

MECANISMO SISTÊMICO

5.10 Envolvimento sistêmico do receptor A₁

A figura 15 apresenta resultados que mostram o envolvimento do receptor A₁ na antinocicepção causada pela inosina no modelo do ácido acético. Primeiramente é possível observar que o 8-PT (antagonista seletivo do receptor A₁) não causou nenhum efeito *'per se'*. Além disso, a inosina e o CHA (agonista seletivo do receptor A₁) causaram significativa antinocicepção. Posteriormente, o pré-tratamento dos animais com 8-PT foi capaz de reverter de maneira significativa a antinocicepção causada pelo CHA e pela inosina.

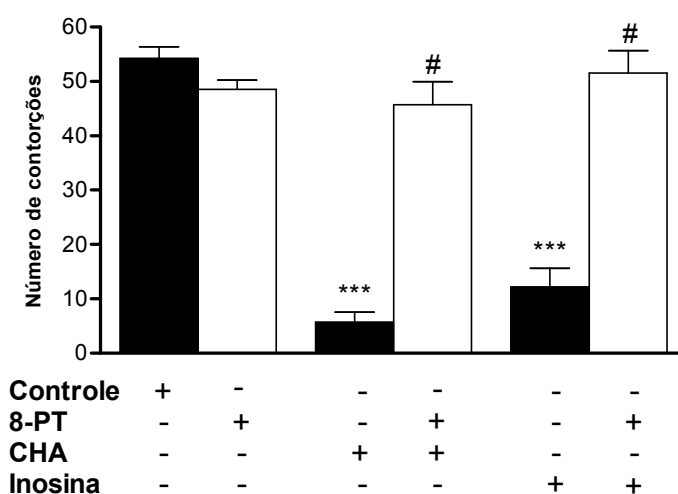


Figura 14. Influência do pré-tratamento com 8-PT sobre o efeito antinociceptivo da inosina (i.p.) no modelo do ácido acético. Influência do pré-tratamento dos camundongos com 8-PT (3 mg/kg, i.p., antagonista do receptor A₁) sobre o efeito antinociceptivo do CHA (0,5 mg/kg, i.p., agonista do receptor A₁) e da inosina (10 mg/kg, i.p.) na nocicepção induzida por ácido acético (0,6%). Cada grupo representa a média de 8-10 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. *** P<0,01 difere significativamente do grupo controle #P<0,01 difere significativamente dos grupos dos animais tratados com inosina e CHA.

5.11 Envolvimento sistêmico do receptor A_{2A}

A figura 16 apresenta resultados que mostram o envolvimento do receptor A_{2A} na antinocicepção causada pela inosina no modelo do ácido acético. Primeiramente é possível observar que o ZM-241385 (antagonista seletivo do receptor A_{2A}) não causou nenhum efeito ‘*per se*’. Além disso, a inosina e o DPMA (agonista misto dos receptores A_2 (A_{2A} e A_{2B})) causaram significativa antinocicepção. Posteriormente, o pré-tratamento dos animais com ZM241385 foi capaz de reverter totalmente a antinocicepção causada pelo DPMA e parcialmente a antinocicepção causada pela inosina.

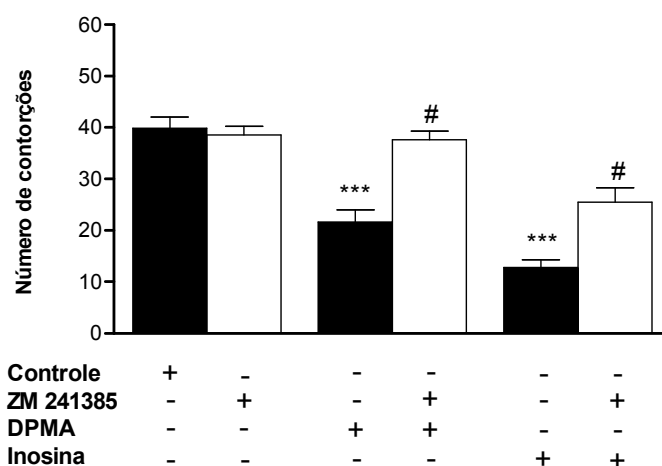


Figura 15. Influência do pré-tratamento com ZM241385 sobre o efeito antinociceptivo da inosina (i.p.) no modelo do ácido acético. Influência do pré-tratamento dos camundongos com ZM241385 (3 mg/kg, i.p., antagonista do receptor A_{2A}) sobre o efeito antinociceptivo do DPMA (1 mg/kg, i.p., agonista não-específico do receptor A_2) e da inosina (10 mg/kg, i.p.) na nocicepção induzida por ácido acético (0,6%). Cada grupo representa a média de 6-10 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. *** $P < 0,001$ difere significativamente do grupo controle # $P < 0,05$ difere significativamente dos grupos dos animais tratados com inosina e DPMA.

MECANISMO PERIFÉRICO

5.13 Envolvimento do receptor A₁

A figura 18 mostra o envolvimento do receptor A₁ na antinocicepção periférica causada pela inosina no modelo do glutamato. Primeiramente é possível observar que o 8-PT (antagonista seletivo do receptor A₁) não causou nenhum efeito *'per se'*. Além disso, a inosina e o CHA (agonista seletivo do receptor A₁) causaram significativa antinocicepção quando co-administrados com o glutamato. Posteriormente, o pré-tratamento dos animais com 8-PT foi capaz de reverter a antinocicepção causada pelo CHA e pela inosina.

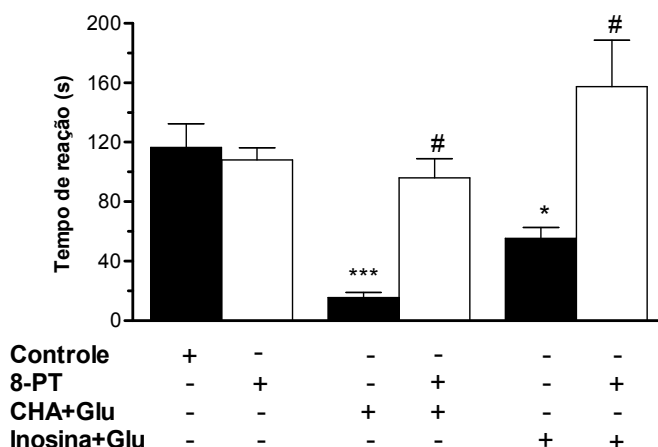


Figura 17. Influência do pré-tratamento com 8-PT sobre o efeito antinociceptivo da inosina (i.pl.) no modelo do glutamato. Influência do pré-tratamento com 8-PT (1 µg/sítio, i.pl., antagonista seletivo do receptor A₁) sobre o efeito antinociceptivo do CHA (10 µg/sítio, i.pl., agonista do receptor A₁) e da inosina (10 µg/sítio, i.pl.) co-administrados com glutamato neutro (10 µmol/sítio, i.pl., pH 7) na nocicepção induzida por glutamato. Cada grupo representa a média de 8-10 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. * P<0,05, *** P<0,001 difere significativamente do grupo controle. #P<0,05 difere significativamente dos grupos dos animais tratados apenas com CHA e inosina co-administrados com glutamato.

5.14 Envolvimento do receptor A_{2A}

A figura 19 mostra o envolvimento do receptor A_{2A} na antinocicepção periférica causada pela inosina no modelo do glutamato. Primeiramente é possível observar que o ZM241385 (antagonista seletivo do receptor A_{2A}) não causou nenhum efeito 'per se'. Além disso, a inosina causou efeito antinociceptivo quando co-administrada com o glutamato, diferentemente do DPMA (agonista misto dos receptores A_2 (A_{2A} e A_{2B})) que co-administrado com o glutamato não causou nenhum efeito distinto em relação ao grupo tratado apenas com glutamato. Posteriormente, o pré-tratamento dos animais com ZM241385 não foi capaz de reverter a antinocicepção causada pela inosina e não causou nenhuma alteração nos animais tratados com DPMA.

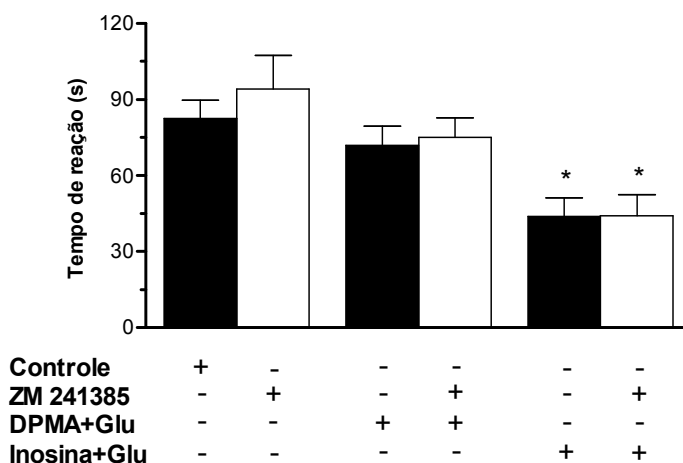


Figura 18. Influência do pré-tratamento com 8-PT sobre o efeito antinociceptivo da inosina (i.pl.) no modelo do glutamato. Influência do pré-tratamento dos camundongos com ZM241385 (15 μ g/sítio, i.pl., antagonista seletivo do receptor A_{2A}) sobre o efeito antinociceptivo da inosina (10 μ g/sítio, i.pl.) co-administrada com glutamato tamponado (10 μ mol/sítio, i.pl.) na nocicepção induzida por glutamato. Cada grupo representa a média de 8-10 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. * $P < 0,05$, difere significativamente do grupo controle.

6. DISCUSSÃO

Como visto, com a exceção dos sistemas cardiovascular e imune, atualmente poucos estudos analisam as funções e efeitos da inosina, deixando uma grande lacuna de pesquisa e perspectivas. Especificamente o efeito antiinflamatório e neuroprotetor atribuídos a inosina, sugerem um envolvimento deste nucleosídeo na nocicepção, surpreendentemente ainda não pesquisado.

Desta forma, primeiramente foi utilizado o modelo de nocicepção visceral induzida por ácido acético para avaliar a ação antinociceptiva da inosina. O modelo do ácido acético é um típico modelo com ótima sensibilidade para dor inflamatória e tem sido muito usado como triagem para pesquisa de novos fármacos com propriedades analgésicas e antiinflamatórias (Koster, Anderson *et al.*, 1959; Le Bars, Gozariu *et al.*, 2001). Já foi demonstrado que a injeção intraperitoneal de ácido acético induz a liberação de diversos mediadores inflamatórios como bradicinina, prostaglandinas e citocinas inflamatórias quando injetado intraperitonealmente (Ribeiro, Vale *et al.*, 2000; Ikeda, Ueno *et al.*, 2001). A inosina quando administrada pela via i.p. reduziu de forma significativa e dependente da dose a nocicepção induzida por ácido acético. Quando administrada oralmente, a inosina também produziu antinocicepção, entretanto, com uma potência bem menor, ou seja, necessitou de uma dose mais elevada para induzir a mesma resposta. Todavia, pelas vias centrais i.t. e i.c.v., a inosina necessitou de doses muito pequenas, na ordem de microgramas para causar inibição dependente da dose. A inosina mostrou-se efetiva até 6 h após sua administração por via intraperitoneal, tendo um pico de ação máxima em torno de 0,5 h após administração. Diferentemente, quando

administrada pela via oral, a inosina teve efeito significativo durante 2 h após sua administração, alcançando um efeito máximo em torno de 1 h.

Assim, comparando as vias de administração na prevenção da nocicepção, a inosina foi aproximadamente 70 vezes mais potente quando administrada pela via i.p. do que pela via oral, isto é facilmente compreendido em virtude da biodisponibilidade das duas vias. Ainda cabe destacar a relevância da eficiência pela via oral, condição extremamente necessária para adesão ao tratamento por parte do paciente, quando se trata de um possível fármaco.

Neste sentido, os dados na literatura corroboram com nossos resultados onde demonstram que agonistas para receptores de adenosina reduzem de forma dependente da dose o número de contorções abdominais (Bastia, Varani *et al.*, 2002; Pechlivanova e Georgiev, 2002).

Como já relatado na introdução, a adenosina (precursor da inosina) está envolvida em várias vias do metabolismo purinérgico, o que a torna um alvo suscetível a sofrer reações por várias enzimas, que podem degradá-la rapidamente, inclusive em inosina (Para revisão ver Sawynok e Liu, 2003; e Hasko *et al.*, 2004). Pode-se ainda acrescentar a isto, estudos onde a adenosina teve um fraco efeito antinociceptivo em modelos animais, mas que foi potencializada quando inibidores do seu metabolismo foram juntamente administrados (Keil e Delander, 1992; 1994; 1995). Desta forma, fica claro que a adenosina possui um tempo de meia vida muito curto (Para revisão ver Hasko *et al.*, 2004), o que pode sugerir que muitos dos efeitos atribuídos a adenosina, sejam na verdade efeitos da inosina. Neste caso, a inosina pode ser favorecida metabolicamente, tendo sua concentração estável por um

período maior (Hasko et al., 2004). Este período maior de estabilidade pode influenciar fortemente em sua atividade farmacológica. De fato, isto pode ser observado em nosso experimento onde a inosina foi cerca de 12 vezes mais potente que a adenosina quando analisada no modelo de nocicepção induzida por ácido acético.

Quando analisado os efeitos da inosina administrada pelas vias centrais, observou-se a elevada potência em produzir antinocicepção. Estes resultados podem ser atribuídos como consequência da farmacocinética da molécula de inosina, assim como devido à influência do sítio de injeção (biodisponibilidade). De fato, o corno dorsal da medula espinhal apresenta uma alta densidade de receptores de adenosina, principalmente do tipo A₁ os quais também podem ser ativados pela inosina (Sawynok, 1998; Gomez e Sitkovsky, 2003; Hasko, Sitkovsky *et al.*, 2004). Estes receptores estão localizados em grande densidade na lâmina II, local onde as principais fibras aferentes nociceptivas fazem suas conexões com neurônios nociceptivos de segunda ordem (Goodman e Synder, 1982; Geiger, Labella *et al.*, 1984; Choca, Green *et al.*, 1988). É sabido que os receptores A₁ são os principais responsáveis em mediar a analgesia espinhal (para revisão ver Sawynok, 1997), fato reforçado por estudos realizados com diferentes agonistas e antagonistas de adenosina em modelos de alodínia (Lee e Yaksh, 1996; Nakamura, Ohta *et al.*, 1997; Khandwala, Zhang *et al.*, 1998; Poon e Sawynok, 1998) e estudos eletrofisiológicos em ratos (Nakamura, Ohta *et al.*, 1997).

Considerando este conjunto de resultados, observou-se pela primeira vez a ação antinociceptiva da inosina, sugerindo que esse nucleosídeo pode representar um importante modulador da nocicepção inflamatória. Além disso,

os nossos resultados juntamente com os dados da literatura demonstram claramente que a inosina é um composto com grande potencial clínico, pois apresenta eficácia quando administrada pela via oral associada a um tempo de ação relativamente prolongado. Ainda demonstrou-se que a inosina apresenta efeito antinociceptivo central, que pode ser muito importante em processos nociceptivos que envolvam uma plasticidade alterada do sistema nervoso central.

Após os primeiros resultados encontrados no modelo do ácido acético, que pode ser utilizado como uma triagem para substâncias antinociceptivas, buscou-se outro modelo com o interesse de verificar a ação da inosina em diferentes tipos de nocicepção, neurogênica e inflamatória. Desta forma, analisou-se o efeito da inosina no modelo de nocicepção induzida pela formalina (2,5%). A formalina é um modelo com características peculiares, que induz nocicepção em dois momentos, chamados fase neurogênica e fase inflamatória, respectivamente. A dor neurogênica, característica da primeira fase deste teste, é causada após a ativação direta dos nociceptores, como fibras C e A δ (Mccall, Tanner *et al.*, 1996; Puig e Sorkin, 1996) e produz um comportamento característico, padronizado como indicativo de dor (Tjolsen, Berge *et al.*, 1992). A dor inflamatória se dá após a liberação de alguns mediadores, causando uma facilitação sensorial e uma sensibilização central da medula espinhal (Hunskar e Hole, 1987; Tjolsen, Berge *et al.*, 1992). Neste sentido, os dados do presente estudo mostram claramente que a inosina foi capaz de inibir de forma significativa e dependente da dose a segunda fase de nocicepção induzida pela formalina, caracterizada pela dor inflamatória, mas não inibiu a nocicepção da fase neurogênica (primeira fase). Após a injeção de

formalina, os nociceptores são caracteristicamente sensibilizados e ativados por mediadores como aminoácidos excitatórios (glutamato), prostaglandinas, taquicininas, óxido nítrico e outros peptídeos (Malmberg e Yaksh, 1992; Tjolsen, Berge *et al.*, 1992; Santos e Calixto, 1997).

O efeito da inosina neste modelo foi semelhante aos resultados encontrados por Zarrindast e colaboradores (2003), que injetaram também intraperitonealmente análogos de adenosina, (R-PIA, CADO e NECA) que reduziram significativamente a nocicepção induzida por formalina, principalmente na fase inflamatória. Em outro estudo, agonistas de receptores de adenosina que foram injetados pela via intratecal no teste da formalina, mostraram supressão da resposta nociceptiva em ambas as fases (Yoon, Bae *et al.*, 2005). Estes resultados somam-se aos de Reeve e Dieckenson (1995) que demonstraram que os agonistas do receptor A_1 administrados intratecalmente foram capazes de suprimir a atividade elétrica de fibras nociceptivas estimuladas por formalina (5%), através de experimentos eletrofisiológicos em ratos. Em contraste, Doak e Sawynok (1995) demonstraram que a adenosina co-administrada intraplantarmente com formalina (0,5%), aumentou o tempo de resposta nociceptiva em ratos. Desta forma, analisando todos estes dados juntamente com nossos resultados, pode-se sugerir que além da atividade antinociceptiva, a inosina pode ser uma substância com potencial antiinflamatório, sendo necessário estudos para a confirmação desta hipótese.

Sabe-se que a injeção de formalina causa sensibilização neuronal através da liberação de vários mediadores, dentre estes o glutamato (Coderre e Yashpal, 1994; Aumeerally, Allen *et al.*, 2004), que injetado na pata de ratos

induz liberação de adenosina, processo que é diretamente dependente das fibras aferentes sensíveis à capsaicina (Liu, White *et al.*, 2001). Além disso, como a adenosina pode regular a nocicepção periférica atuando em fibras aferentes sensoriais (Aley e Levine, 1997; Sawynok, 1998), optou-se por avaliar a atividade antinociceptiva da inosina no modelo de nocicepção periférica induzida pela injeção intraplantar de glutamato. Neste teste, a inosina administrada pela via i.p., inibiu de forma significativa e dependente da dose a nocicepção induzida pelo glutamato. O glutamato, agente algogênico deste modelo, juntamente com seus receptores, forma o mais importante sistema de neurotransmissores excitatórios do sistema nervoso. Os receptores de glutamato são divididos em duas classes, os ionotrópicos que são aqueles acoplados a canais iônicos, e os metabotrópicos que são acoplados à proteína G. O primeiro grupo inclui os receptores de NMDA, AMPA e cainato, enquanto o segundo grupo possui 8 subtipos de receptores, tendo como principal representante o receptor de trans-ACPD. Ambos os grupos modulam a formação de segundos mensageiros e mediadores intracelulares (Fundytus, 2001; Fundytus, Yashpal *et al.*, 2001).

A ativação dos receptores de glutamato leva à liberação de adenosina em sítios periféricos e centrais, o que pode induzir uma retroalimentação negativa através da ativação de receptores A₁, promovendo antinocicepção (ver figura 21) (Liu, White *et al.*, 2002; Aumeerally, Allen *et al.*, 2004). Neste caso, a adenosina também inibe a liberação de alguns neurotransmissores por uma ação pré-sináptica, ou pós-sinápticamente através da hiperpolarização da célula inibindo as ações dos neurotransmissores. Assim, a adenosina exerce

funções na neuroproteção e homeostasia, sendo estas ações igualmente mediadas pelo receptor A₁ (Dunwiddie e Masino, 2001; Latini e Pedata, 2001).

A participação do glutamato na modulação da nocicepção em sítios centrais é bem conhecida, e trabalhos mais recentes têm mostrado também a importância da modulação em sítios periféricos (Ozawa, Kamiya *et al.*, 1998; Millan, 1999; Fundytus, 2001; Beirith, Santos *et al.*, 2002). Baseando-se nestas informações, uma vez que não foram encontrados na literatura estudos sobre metabólitos ou receptores de adenosina em modelos animais de nocicepção periférica, escolheu-se o modelo de nocicepção induzida pelo glutamato co-administrado com inosina para avaliar a possível antinocicepção periférica deste nucleosídeo. Igualmente ao resultado obtido com a inosina administrada pela via i.p., a co-administração de inosina com glutamato pela via i.pl. reduziu significativamente e de forma dependente da dose a resposta nociceptiva induzida pelo glutamato. Liu e colaboradores (2001) demonstraram que a injeção periférica de glutamato na pata de rato promove a liberação de adenosina via fibras aferentes sensoriais sensíveis a capsaicina. Em adição, receptores de adenosina foram encontrados em terminais sensoriais aferentes, os quais, uma vez ativados, podem facilitar ou inibir a transmissão nociceptiva (Schulte, Robertson *et al.*, 2003). Assim, nossos resultados podem sugerir que a inosina pode atuar diretamente ou somar-se a adenosina liberada após a injeção de glutamato, e favorecer a inibição da nocicepção causada pelo glutamato através dos receptores de adenosina localizados nas fibras aferentes com terminações na periferia. Embora a relação entre glutamato e adenosina na nocicepção já esteja bem estabelecida por alguns autores (Liu, White *et al.*, 2002; Aumeerally, Allen *et al.*, 2004), não foi encontrado na literatura trabalhos

avaliando a atividade da adenosina no modelo de nocicepção induzida pelo glutamato, tampouco há evidências relatando uma interação entre inosina e glutamato. Logo, os resultados encontrados nesse estudo evidenciam um novo e importante achado, o envolvimento da inosina na nocicepção induzida por glutamato.

De fato, os resultados da inosina neste modelo são bastante relevantes, uma vez que diversos trabalhos demonstram que fármacos que possuem a capacidade de bloquear as ações do glutamato e de outros agonistas de seus receptores são potentes substâncias antinociceptivas em muitas espécies de mamíferos, inclusive em humanos (Lutfy, Cai *et al.*, 1997; Nakamura, Ohta *et al.*, 1997; Neugebauer, 2002; Wiech, Kiefer *et al.*, 2004).

Após a verificação do efeito antinociceptivo da inosina nos modelos já citados, os resultados obtidos no teste do campo aberto excluíram a possibilidade da inosina causar algum déficit locomotor ou muscular que pudesse interferir na resposta comportamental dos animais à dor. Pelo contrário, indicou que doses de inosina muito superiores às que causam antinocicepção são incapazes de induzir efeitos colaterais visíveis, como tremores, piloereção, convulsões, perda do tônus entre outros.

A percepção e condução do sinal nociceptivo até o corno da medula espinhal, como já visto, é na sua grande maioria função das fibras aferentes primárias, principalmente as do tipo C e A (Hunt e Mantyh, 2001; Julius e Basbaum, 2001). Estudos eletrofisiológicos demonstraram que a administração de um agonista seletivo para receptor A₁ (CPA) ou de um agonista não-seletivo (CADO), inibiram a resposta evocada por fibras C após administração de formalina. Por outro lado, quando analisado a resposta de fibras Aδ após

administração de CPA e CADO, ambos agonistas não exerceram efeito sobre a atividade elétrica destas fibras (Reeve e Dieckenson, 1995). Analisando fibras C aferentes vagais de pulmões de cobais, um estudo evidenciou a presença de receptores A_1 e A_{2A} através de técnicas de registro extracelular. Primeiramente, a adenosina promoveu descarga de potencial de ação nestas fibras, efeito que foi mimetizado pela adição de CPA e CGS 21680 (agonistas A_1 e A_{2A} , respectivamente). Posteriormente, os antagonistas dos receptores A_1 (DPCPX) e A_{2A} (SCH58261) reverteram estes efeitos. Para finalizar, técnicas de PCR (Reação em cadeia pela polimerase) e fixação de membrana confirmaram a expressão dos receptores A_1 e A_{2A} em fibras C sensíveis à capsaicina. Todo este protocolo foi utilizado também para avaliação das fibras do tipo A, mas não se obteve nenhuma evidência de receptores de adenosina neste tipo de fibra, provavelmente devido a baixa densidade dos receptores adenosinérgicos nestas fibras. Por fim, os mesmos agonistas não alteraram o limiar de disparo de fibras $A\beta$ (mecanocceptoras e proprioceptoras), indicando seletividade, pois atuaram apenas sobre as fibras envolvidas nos processos nociceptivos (Chuaychoo, Lee *et al.*, 2006). Assim, nossos resultados evidenciam farmacologicamente que o efeito antinociceptivo da inosina é dependente das fibras aferentes sensíveis à capsaicina, tendo em vista que o pré-tratamento neonatal dos animais com capsaicina aboliu completamente o efeito antinociceptivo da inosina no modelo do ácido acético.

Neste trabalho foi também estudado a participação da proteína $G_{i/o}$ sensível a toxina pertussis, tendo em vista que os receptores da adenosina são acoplados a este tipo de proteína G. A toxina Pertussis causa inativação da subunidade α da proteína $G_{i/o}$ por ribosilação catalítica, impedindo o

acoplamento desta proteína com receptores metabotrópicos (Klinger, Freissmuth *et al.*, 2002; Savinainen e Laitinen, 2004). Desta forma, fármacos que dependem deste acoplamento para a transdução do sinal, tornam-se inativos mesmo ligando-se ao seu receptor específico. Um exemplo clássico de fármaco que ativa um mecanismo operado pela proteína $G_{i/o}$ é a morfina, que foi utilizada como controle positivo em nosso experimento (Fields e Casey, 1997; Santos, De Campos *et al.*, 1999). A ativação da subunidade α da proteína $G_{i/o}$ está associada ao bloqueio dos canais de cálcio-voltagem-dependente e ativação dos canais de potássio, resultando em hiperpolarização da membrana neuronal, processo que inibe o disparo do potencial de ação da célula e conseqüentemente inibe a transmissão nociceptiva (Pertwee, 1999; Schultz e Gross, 2001; Savinainen e Laitinen, 2004). Neste sentido, os nossos dados demonstram que o efeito antinociceptivo da inosina é dependente da ativação da proteína $G_{i/o}$ (ver figuras 20 e 21).

Todos os receptores de adenosina são acoplados à proteína G. Os receptores A_1 e A_3 são acoplados à proteína $G_{i/o}$, o receptor A_{2A} à proteína $G_{s/olf}$ e o receptor A_{2B} à proteína $G_{s/q}$ (Para revisão ver Sawynok e Liu, 2003; Jacobson e Guao, 2006; Blum *et al.*, 2003; Klinger *et al.*, 2002). Em experimentos realizados com ratos no modelo de dor pós-operatória, a administração intratecal do agonista do receptor A_1 (R-PIA) reduziu o comportamento nociceptivo dos animais. Posteriormente, o pré-tratamento dos animais com toxina Pertussis, forskolina (ativador de AMPc) e com tetraetilamônio (bloqueador de canais do potássio) bloqueou o efeito do agonista, indicando que a proteína $G_{i/o}$, a inibição da adenilato ciclase e a ativação dos canais de potássio, respectivamente, estão envolvidos na

antinocicepção causada pela ativação do receptor A₁ (Marala e Mustafa, 1995a; 1995b; Zahn, Straub *et al.*, 2007). Em relação à inosina, estudos avaliando a atividade biológica deste nucleosídeo em células dendríticas de humanos, demonstraram que a inosina estimulou de forma dependente da dose as correntes transitórias de Ca²⁺. Este efeito é mediado por um mecanismo independente dos receptores de adenosina, visto que o tratamento destas células com antagonistas dos receptores de adenosina e com toxina pertussis não inibiram o efeito da inosina (Idzko, Panther *et al.*, 2004).

De acordo com os nossos resultados que comprovam a atividade antinociceptiva da inosina e sua atuação via receptores acoplados à proteína G, somando-se a vários trabalhos que discutem a função da inosina como um provável/possível ativador natural dos receptores de adenosina, este trabalhou procurou investigar quais os receptores de adenosina que estariam envolvidos neste processo tanto em nível sistêmico como periférico.

O envolvimento dos receptores de adenosina na nocicepção teve sua pesquisa iniciada certamente após dois estudos clássicos em meados da década de 1960 (Keele e Armstrong; Collier) que provaram que o ATP e a adenosina alteravam a transmissão nociceptiva atuando central ou periféricamente (Sawynok e Reid, 1997). Desde então, a função das purinas e de seus receptores na nocicepção tem sido alvo de intensa pesquisa por inúmeras razões. Análogos de adenosina possuem propriedades antinociceptivas em vários testes, incluindo dor neuropática (Guieu, Peragut *et al.*, 1996; Ribeiro, Sebastiao *et al.*, 2002; Da Silva Torres, Bonan *et al.*, 2003; Zarrindast, Matinrokh *et al.*, 2003; Abo-Salem, Hayallah *et al.*, 2004). A administração de morfina aumenta a liberação de adenosina em preparações

de sinaptossomas da medula espinal, sendo que esta adenosina contribui para a eficácia espinhal dos opióides (Cahill, White *et al.*, 1995; Sandner-Kiesling, Li *et al.*, 2001); para revisão ver Sawynok e Liu, 2003). Contraditoriamente, a cafeína, que é um antagonista não-seletivo dos receptores de adenosina, possui efeito analgésico quando administrado como coadjuvante com AINES (Abo-Salem, Hayallah *et al.*, 2004). Isto permite sugerir que os efeitos das purinas na nocicepção são complexos e que estes efeitos dependem do subtipo de receptor adenosinérgico que é ativado e da localização dos mesmos.

Estudos prévios têm mostrado que a inosina atua através de ligação aos receptores de adenosina A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 (Hasko, Kuhel *et al.*, 2000; Mabley, Pacher *et al.*, 2003; Idzko, Panther *et al.*, 2004; De Souza, Gelain *et al.*, 2006). Neste trabalho, foi investigado o efeito da inosina sobre os receptores A_1 , A_{2A} e A_{2B} porque a ativação destes receptores está diretamente relacionada com a modulação da dor (Sawynok, 1998; Ribeiro, Sebastiao *et al.*, 2002; Sawynok e Liu, 2003). A análise do mecanismo de ação da inosina excluiu o envolvimento do receptor A_3 neste estudo, pelo motivo que a grande maioria de trabalhos acerca deste receptor não o indicarem como modulador da nocicepção. Ainda assim, os poucos trabalhos que relacionam o receptor A_3 com nocicepção, indicam uma ação pró-nociceptiva deste receptor. No entanto, não se pode desconsiderar um possível envolvimento deste receptor na transmissão ou inibição da informação nociceptiva através da administração de inosina, visto que ainda nenhum estudo avaliou esta função. Assim, fica aberta uma lacuna para posteriores estudos.

Inicialmente avaliou-se o envolvimento do receptor A_1 de adenosina, utilizando agonista e antagonista seletivos para este receptor. Nossos experimentos primeiramente mostraram a atividade antinociceptiva do agonista do receptor A_1 e da inosina. Em seguida, o antagonista seletivo de receptores A_1 de adenosina, 8-PT, reverteu o efeito antinociceptivo do CHA, agonista seletivo A_1 . Além disso, o mesmo antagonista também reverteu o efeito antinociceptivo da inosina. Este resultado sugere a participação do receptor de adenosina A_1 na antinocicepção mediada pela inosina. Os receptores de adenosina do tipo A_1 são distribuídos amplamente no sistema nervoso central, localizando-se com alta densidade no córtex cerebral, cerebelo, hipocampo, corno dorsal e medula espinhal (Ralevic e Burnstock, 1998; Sawynok e Liu, 2003). Os receptores A_1 são acoplados às proteínas G da classe $G_{i/o}$ e a sua ativação se dá via abertura dos canais de potássio e inibição da adenilato ciclase (Klinger, Freissmuth *et al.*, 2002; Sawynok e Liu, 2003). O receptor possui preferência de acoplamento com a proteína G_i sobre a proteína G_o . Experimentos com o objetivo de demonstrar ativação da proteína G_z (o membro da família $G_{i/o}$ que é resistente à toxina Pertussis) através da ativação do receptor A_1 , não foram bem sucedidos (Fredholm, Proctor *et al.*, 1989; Ralevic e Burnstock, 1991; Van Der Ploeg, Altiok *et al.*, 1991; Hasuo, Matsuoka *et al.*, 2002; Klinger, Freissmuth *et al.*, 2002). A ativação da proteína G_i através do receptor A_1 inibe a adenilato ciclase, que conseqüentemente reduz a produção de AMPc. Além disso, a ativação de receptores A_1 localizados no corno dorsal da medula espinhal, pode causar uma inibição pós-sináptica da transmissão excitatória devido a uma ativação dos canais de K^+ , inibição de canais de Ca^{+2} e hiperpolarização (Doi, Kuzuna *et al.*, 1987; Salter, De Koninck *et al.*, 1993;

Patel, Pinnock *et al.*, 2001; Sawynok e Liu, 2003). Além disso, a ativação dos receptores A₁ reduz a liberação de SP e CGRP (Santicioli, Del Bianco *et al.*, 1992; Sperlagh, Zsilla *et al.*, 2001) de fibras aferentes nociceptivas, e participa de mecanismos de inibição pré e pós-sináptica segundo estudos realizados em cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal e fatias da medula espinhal (Macdonald, Skerrett *et al.*, 1986; Patel, Pinnock *et al.*, 2001). Assim, todos estes mecanismos estão envolvidos na modulação da nocicepção via receptor A₁ (Fredholm, Ap *et al.*, 2001; Blum, Hourez *et al.*, 2003; Sawynok e Liu, 2003; Jacobson e Gao, 2006; Rogel, Bromberg *et al.*, 2006).

Estudos em animais geneticamente modificados mostraram a importância da participação do receptor A₁ na modulação da transmissão nociceptiva. Neste estudo, os animais que não possuíam o receptor A₁ eram hipersensíveis e mais responsivos a estímulos nocivos em comparação com animais selvagens, incluindo modelos de dor neuropática (Wu, Hao *et al.*, 2005). Outros estudos relatam que agonistas do receptor A₁ produzem uma significativa antinocicepção, administrados por diferentes vias em diferentes modelos de nocicepção (Guieu, Peragut *et al.*, 1996; Bastia, Varani *et al.*, 2002; Jacobson e Gao, 2006). Zahn e colaboradores (2007) demonstraram em um modelo de dor pós-operatória o envolvimento do receptor A₁ na antinocicepção. Além disso, estudos realizados *in vivo* sugerem que este efeito é mediado pela ativação da proteína G sensível à toxina Pertussis, pela inibição da adenilato ciclase e pelo aumento da condutância dos canais de K⁺.

Desta forma, os nossos resultados estendem e confirmam os dados da literatura, pois demonstram claramente a participação do receptor A₁ de adenosina na antinocicepção e ainda demonstram que este receptor é também

responsável pela mediação do efeito antinociceptivo da inosina no modelo de nocicepção induzida por ácido acético. Baseando-se na literatura já citada, pode-se sugerir que este efeito antinociceptivo da inosina via receptor A_1 deve envolver a participação da proteína $G_{i/o}$, a inibição da adenilato ciclase e a redução da produção do segundo mensageiro AMPc. Além disso, o aumento da condutância dos canais de K^+ e a inibição as correntes de Ca^{2+} também devem estar envolvidos neste efeito antinociceptivo (ver figura 20).

Após a análise do envolvimento do receptor A_1 , foi avaliado o envolvimento do receptor A_{2A} . Neste experimento, observou-se que o DPMA (agonista misto não seletivo de receptores A_2) apresentou efeito antinociceptivo semelhante à inosina. O antagonista seletivo do receptor A_{2A} (ZM241385) reverteu totalmente a antinocicepção induzida pelo DPMA, além de reverter de forma parcial o efeito da inosina. Os receptores A_{2A} são encontrados em leucócitos, neutrófilos, plaquetas, vasos sanguíneos, na região do corno dorsal da medula espinhal e em muitas estruturas do SNC. No SNC os receptores A_{2A} são amplamente distribuídos no estriado, mas outras áreas do encéfalo sua densidade é bem menor. Uma parte destes receptores que estão localizados pré-sinápticamente em terminais corticoestriatais, controlam a liberação de glutamato destes locais (Goodman, Kuhar *et al.*, 1983; Karlsten, Gordh *et al.*, 1992; Ongini e Fredholm, 1996; Sawynok, 1998; Blum, Hourez *et al.*, 2003; Sawynok e Liu, 2003).

A ativação do receptor A_{2A} aumenta a atividade da adenilato ciclase e conseqüentemente a produção do segundo mensageiro AMPc. A proteína G_s parece ser a principal proteína G associada com o receptor A_{2A} em sistemas periféricos, mas não em estruturas centrais (Blum, Hourez *et al.*, 2003;

Sawynok, 2007). Os receptores A_{2A} também são acoplados a vários canais de potássio (Regaya, Pham *et al.*, 2004) inclusive canais K^+_{ATP} em músculo liso (Dart e Standen, 1993; Prior, Yates *et al.*, 1999; Haynes, 2000). Em relação aos canais de Ca^{2+} , contudo, alguns dados são contraditórios, tendo em vista que eles indicam que a estimulação do receptor A_{2A} ativa estes canais pré-sinápticamente, facilitando a transmissão sináptica e a liberação de transmissores. Este mecanismo provavelmente envolve a adenilato ciclase e a ativação de uma proteína quinase dependente de AMPc (Ralevic e Burnstock, 1998). Outros trabalhos indicam que uma inibição dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes levaria à redução da liberação de transmissores (Latini, Pazzagli *et al.*, 1996; Edwards e Robertson, 1999). Assim, todos estes mecanismos estariam modulando a nocicepção através da ativação dos receptores A_{2A} (Para revisão ver Sawynok e Liu, 2003). Em níveis supraespinhais, a ativação dos receptores A_{2A} pode facilitar ou inibir a liberação de neurotransmissores, dependendo da área do encéfalo (Dunwiddie e Masino, 2001).

Sistemicamente e espinhalmente há ainda muitas contradições em relação ao efeito dos receptores A_2 na nocicepção (Sawynok, 1998; Yoon, Bae *et al.*, 2005). Em estudos eletrofisiológicos usando fatias de medula espinhal, foi verificado que o agonista do receptor A_{2A} CGS21680 produz efeitos tanto estimulatórios quanto inibitórios (Patel, Pinnock *et al.*, 2001). No entanto, vários estudos com agonistas e antagonistas para receptores A_2 convergem para a importância dos receptores A_2 na modulação da nocicepção espinhal, mas divergem quanto ao efeito deste receptor quando ativado, se é pró-nociceptivo (Ledent, Vaugeois *et al.*, 1997; Bastia, Varani *et al.*, 2002) ou antinociceptivo

(Delander e Hopkins, 1986; Yoon, Bae *et al.*, 2005). Entretanto, alguns autores relataram um aumento da expressão de receptores A_{2A} na medula espinhal, após lesões por isquemia ou seguido de lesão espinhal. Isto sugere uma possível ação neuroprotetora para este receptor (Mcadoo, Robak *et al.*, 2000; Cassada, Gangemi *et al.*, 2001; Cassada, Tribble *et al.*, 2002).

Borghi e colaboradores (2002) mostraram que a injeção intraperitoneal de um agonista A_{2A} em camundongos, reduziu o tempo de resposta à formalina. Outros autores mostraram que a ativação do receptor A_{2A} resulta em antinocicepção em um modelo de contorções abdominais em camundongos, induzido por caolina (Herrick-Davis, Chippari *et al.*, 1989; Pechlivanova e Georgiev, 2002). Pode-se acrescentar a isto, que em outros modelos de nocicepção como placa quente ou de alodínia, o receptor A_{2A} também se mostrou mediador da antinocicepção quando ativado sistêmica ou espinhalmente (Holmgren, Hedner *et al.*, 1986; Sawynok, 1998).

Para alguns autores, o efeito antinociceptivo de agonistas A_{2A} só ocorre em altas doses, quando pode haver uma perda da seletividade e uma eventual ativação dos receptores A_1 (Lee e Yaksh, 1996; Poon e Sawynok, 1998). Ainda é necessário admitir que a atividade antiinflamatória de agonistas A_{2A} pode ser importante em modelos de dor inflamatória (Lappas, Sullivan *et al.*, 2005; Akkari, Burbiel *et al.*, 2006), onde o receptor A_{2A} pode modular a nocicepção através de seu efeito antiinflamatório, inibindo a síntese/liberação de mediadores inflamatórios que sensibilizam nociceptores. Apesar de tantos trabalhos mostrando que o receptor A_{2A} ativado causa antinocicepção, o mecanismo desta ação ainda não está bem esclarecido. Tentando entender este mecanismo, Ragaya e colabores (2004) demonstraram que a apamina e

Lei-Dab 7 (bloqueadores não-seletivos de canais de K^+ ativados por Ca^{2+} de baixa condutância) reverteram o efeito antinociceptivo causado pelo CGS 21680 (agonista A_{2A}) utilizando a placa quente e o *tail pinch* como modelos de nocicepção. Diferentemente, a kaliotoxina (bloqueador de canais de K^+ voltagem-dependentes) não reverteu a antinocicepção causada pelo CGS 21680. Deste modo, este estudo demonstrou que os canais de K^+ ativados por cálcio sensíveis à apamina estão envolvidos na antinocicepção mediada pelo receptor A_{2A} , mas não os canais de K^+ voltagem-dependentes. Alguns trabalhos sugerem que os receptores NMDA (Bordi e Quataroli, 2000; Chizh et al., 2001), são alvos dos receptores A_{2A} , através de interações receptor-receptor (Costenla, De Mendonca et al., 1999). Isto se daria através da supressão das correntes do receptor NMDA devido ativação do receptor A_{2A} via cascata fosfolipase C/IP3 (Norenberg, Wirkner et al., 1997; Wirkner, Assmann et al., 2000).

Por outro lado, alguns trabalhos demonstraram que a ativação de receptores A_{2A} sistemicamente/espinalmente induz nocicepção (Bastia, Varani et al., 2002). Além disso, no modelos de contorção abdominal e da placa quente, a injeção intraperitoneal do agonista A_{2A} (CGS21680) induziu nocicepção enquanto que o antagonista SCH58261 produziu antinocicepção (Bastia, Varani et al., 2002). Ledent e colaboradores (1997) demonstraram que animais que não possuíam o receptor A_{2A} foram hipoalgésicos em modelos de nocicepção, ou seja, que o receptor A_{2A} é importante na transmissão da informação nociceptiva. Outro importante trabalho publicado recentemente, também utilizando animais com a ausência do receptor A_{2A} , mostrou que estes animais apresentaram uma resposta nociceptiva diminuída em relação aos

animais selvagens, no teste da formalina. A mesma resposta foi obtida em animais selvagens que receberam o antagonista seletivo de receptores A_{2A} (SCH 58261) (Hussey, Clarke *et al.*, 2007).

Em meio a estes inúmeros trabalhos com resultados tão díspares entre si, nossos experimentos demonstram que o receptor A_{2A} exerce antinocicepção quando ativado pela inosina no modelo do ácido acético. Esta atividade antinociceptiva deve se realizar através da mediação de canais de K^+ ativados por cálcio ou K^+_{ATP} sensíveis, pela inibição da liberação de transmissores como o glutamato, a SP e o CGRP (ver figura 20). Ainda não se pode descartar uma possível inibição do receptor NMDA ou até mesmo uma ação antinociceptiva devido a atividade antiinflamatória induzida pela ativação do receptor A_{2A} , visto que o modelo do ácido acético induz nocicepção visceral inflamatória.

O receptor A_{2B} é amplamente distribuído no SNC assim como o receptor A_3 , mas ambos em densidade muito baixa, além de terem pouca afinidade pela adenosina em relação aos receptores A_1 e A_{2A} . Na periferia, o receptor A_{2B} é encontrado no baço, timo, leucócitos e plaquetas (Feoktistov e Biaggioni, 1997; Abo-Salem, Hayallah *et al.*, 2004). O receptor A_{2B} tem sido relatado como mediador pró-nociceptivo tanto sistêmica como perifericamente (Sawynok e Reid, 1997; Abo-Salem, Hayallah *et al.*, 2004). Em nossos experimentos, a aloxazina, antagonista do receptor A_{2B} , não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo exercido pelo DPMA, tampouco pela inosina. Cabe destacar, que a aloxazina também não aumentou o efeito antinociceptivo da inosina ou DPMA, excluindo totalmente a participação do receptor A_{2B} no efeito da inosina no modelo do ácido acético. Ainda pode-se cogitar que a baixa afinidade destes receptores para a adenosina possa também ocorrer para a inosina e

somando-se a baixa densidade destes receptores (Sawynok e Liu, 2003; Sawynok, 2007), facilmente deduz-se o não envolvimento deste receptor no efeito da inosina.

Periféricamente, a adenosina pode exercer diferentes efeitos na sinalização da dor, dependendo dos receptores ou células que sejam ativados. Desta forma, a adenosina pode inibir a transmissão da dor quando ativar receptores do tipo A_1 , entretanto aumenta a dor quando se liga a receptores A_{2A} . Estas ações são devido ao aumento ou diminuição da produção de AMPc (Taiwo e Levine, 1990; Aley, Green *et al.*, 1995; Sawynok e Liu, 2003). Estudos de Aumeerally e colaboradores (2004), demonstraram que a adenosina liberada após injeção periférica de glutamato era capaz de inibir a sinalização da nocicepção induzida por formalina, e que este efeito de inibição da nocicepção periférica foi mediado pela ativação do receptor A_1 . Em fibras aferentes nociceptivas, o receptor A_1 de adenosina e o receptor μ -opióide formam um multireceptor que é ligado a vias de segundos mensageiros. Desta forma, se o receptor A_1 de adenosina estiver dimerizado com o receptor μ -opióide, quando ativado pode inibir a adenilato ciclase e as correntes de Ca^{2+} , além de aumentar a condutância de K^+ e induzir uma inibição da liberação de neurotransmissores (ver figura 21) (Para revisão ver Sawynok e Liu, 2003).

Vários estudos já demonstraram que terminais nervosos aferentes primários que contém receptores A_1 e A_{2A} de adenosina, podem inibir ou facilitar a transmissão nociceptiva periférica, respectivamente (Taiwo e Levine, 1990; Aley e Levine, 1997; Sawynok, Reid *et al.*, 1999). Além disso, a adenosina ainda pode liberar serotonina e histamina de mastócitos após ativação dos receptores A_{2B} ou A_3 (Sawynok, 1997). A administração periférica

de glutamato pode induzir a liberação de adenosina de fibras aferentes sensíveis à capsaicina, e os receptores NMDA e não-NMDA estão envolvidos neste processo (ver figura 21) (Liu, White *et al.*, 2002).

A administração local de agonistas A_2 aumenta a resposta à dor nos modelos de hiperalgesia mecânica e formalina (Taiwo e Levine, 1990). Esta resposta é muito semelhante à ativação do receptor A_{2A} especificamente pelo agonista seletivo CGS21680 (Doak e Sawynok, 1995). A ação dos receptores A_2 de adenosina como pró-nociceptivos periféricamente é proposto como resultado da estimulação da AC resultando em um aumento dos níveis de AMPc no neurônio sensorial (Sawynok e Reid, 1997; Sawynok e Liu, 2003). Há trabalhos que mostram que a administração local de agonistas A_{2A} produziu efeito antinociceptivo, mas apenas em doses muito altas. Este efeito pode ser atribuído devido à absorção sistêmica do fármaco (Sawynok e Liu, 2003), e confirma os diferentes efeitos da ativação do receptor A_{2A} tratando-se de efeito sistêmico ou periférico.

Neste trabalho pode-se observar que o antagonista de receptor A_1 8-PT reverteu de forma significativa a resposta nociceptiva induzida pela injeção de glutamato co-administrado com CHA (agonista seletivo A_1). Após isso, foi verificado que o 8-PT também reverteu o efeito antinociceptivo da inosina demonstrando desta maneira que a ativação do receptor A_1 é necessária para o efeito periférico da inosina. Diferentemente dos resultados obtido na análise do mecanismo sistêmico, o agonista misto DPMA de receptores A_2 não exerceu antinocicepção quando co-administrado com glutamato. Porém, também não demonstrou atividade nociceptiva, ou seja, não apresentou efeito *per se*, assim como o antagonista para receptores A_{2A} ZM241385. O mesmo

antagonista não alterou a resposta induzida pela inosina excluindo a possibilidade do envolvimento do receptor A_{2A} na antinocicepção periférica exercida pela inosina. Portanto, nossos resultados corroboram em parte com dados da literatura já citados, onde demonstram que a atividade antinociceptiva pode ser mediada pelo receptor A_1 (ver figura 21). Por outro lado, demonstramos que o receptor A_{2A} não está envolvido na modulação da transmissão nociceptiva periféricamente, ou seja, sua ativação não foi pró e nem antinociceptiva.

Assim, o uso de fármacos seletivos para receptores A_{2A} e A_{2B} utilizados em experimentos *in vitro* e *in vivo*, serão muito importantes para esclarecer inequivocadamente o envolvimento dos receptores A_2 na modulação da dor, e principalmente diferenciar a ação de acordo com a localização do receptor, modelo de nocicepção utilizado, além da dose e seletividade do agonista ou antagonista

Em síntese, os nossos dados demonstram claramente todo o potencial da inosina como fármaco antinociceptivo, tendo em vista que a mesma foi capaz de inibir a nocicepção avaliada em vários modelos de dor, por diferentes vias de administração e mostrou-se eficaz por um período relativamente longo. Além disso, este estudo também indicou os possíveis mecanismos de ação ativados pela inosina para efetivação destes efeitos, e sugere a necessidade de estudos adicionais com intuito de fortalecer o potencial terapêutico da inosina como analgésica.

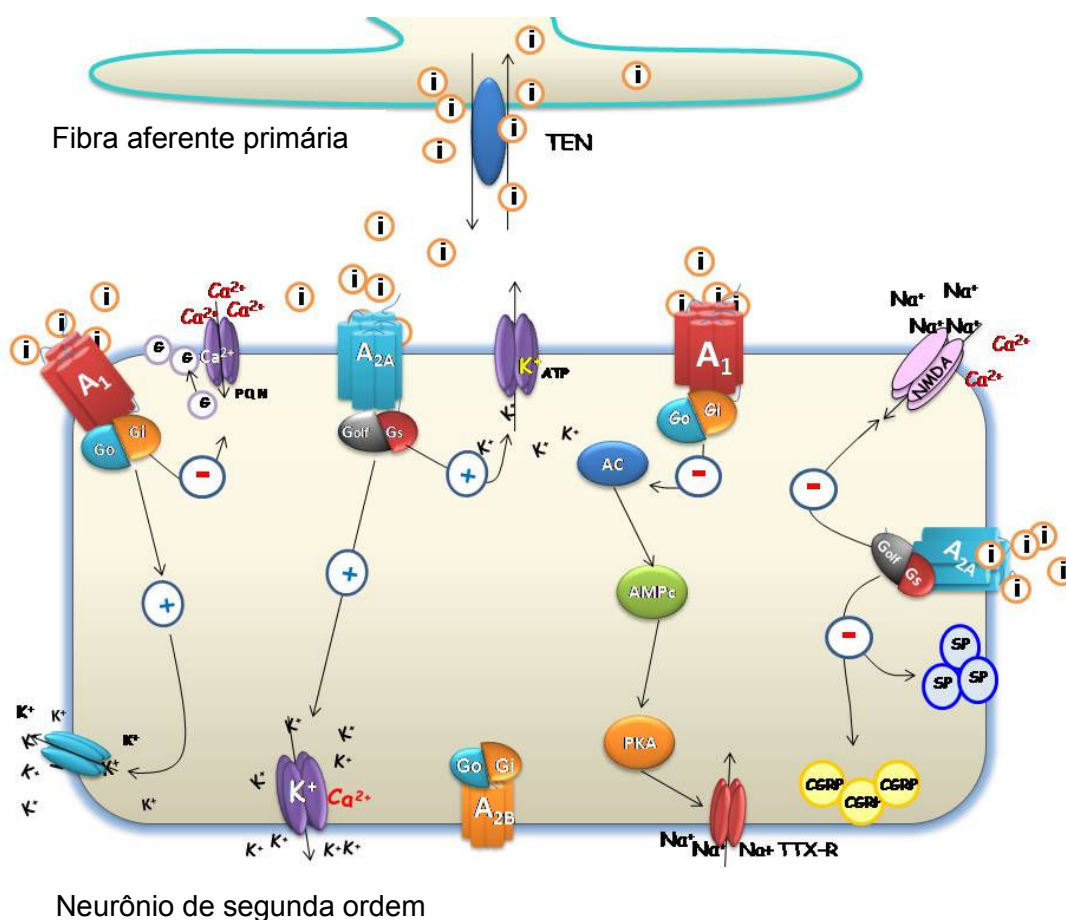
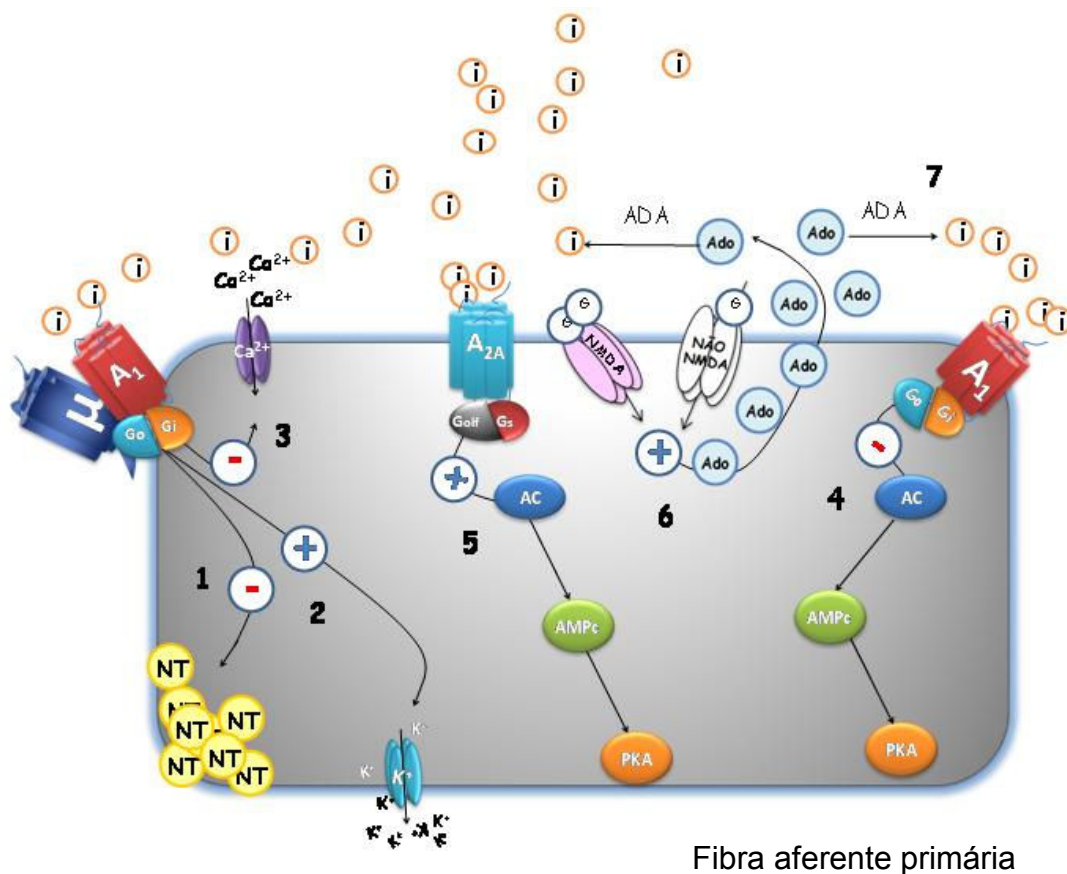


Figura 19. Prováveis mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva da inosina sistemicamente. Via receptor A_1 a inosina pode exercer ação antinociceptiva através da ativação dos canais de K^+ (1); inibição dos canais de Ca^{2+} e da liberação de glutamato (2); inibição da via AC/AMPC (3). Via receptor A_{2A} a inosina pode exercer efeito antinociceptivo devido à ativação dos canais de K^+ ativados por Ca^{2+} (4); ativação dos canais de K^+ ativados por ATP (5); inibição da liberação de CGRP e SP (6); inibição do receptor ionotrópico de NMDA (7).



Fibra aferente primária

Figura 20. Prováveis mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva da inosina periféricamente. Via receptor A₁, inibição da liberação de neurotransmissores (1); ativação dos canais de K⁺ (2); inibição dos canais de Ca²⁺ (3); inibição da via AC/AMPC (4). Via receptor A_{2A}, ativação da via AC/AMPC não causou efeito (5). Ativação dos receptores glutamatérgicos NMDA e não-NMDA e liberação de adenosina (6); conversão da adenosina em inosina pela *adenosina desaminase* (ADA) e conseqüente ativação dos receptores de adenosina (7).

7. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

- A inosina possui atividade antinociceptiva quando administrada sistêmica, central e periféricamente nos modelos de nocicepção induzida pelo ácido acético, formalina e glutamato. Além disso, a inosina em doses elevadas não causou nenhum déficit locomotor ou efeito colateral aparente.

- A atividade antinociceptiva da inosina é dependente das fibras aferentes sensíveis à capsaicina e da proteína $G_{i/o}$ sensível à toxina Pertussis.

- Sistemicamente, a atividade antinociceptiva da inosina envolve a ativação dos receptores A_1 e A_{2A} , mas não o receptor A_{2B} .

- Periféricamente, a atividade antinociceptiva da inosina envolve a ativação do receptor A_1 , mas não o receptor A_{2A} .

8. REFERÊNCIAS

Abo-Salem, O. M., A. M. Hayallah, *et al.* Antinociceptive effects of novel A2B adenosine receptor antagonists. J Pharmacol Exp Ther, v.308, n.1, Jan, p.358-66. 2004.

Akkari, R., J. C. Burbiel, *et al.* Recent progress in the development of adenosine receptor ligands as antiinflammatory drugs. Curr Top Med Chem, v.6, n.13, p.1375-99. 2006.

Aley, K. O., P. G. Green, *et al.* Opioid and adenosine peripheral antinociception are subject to tolerance and withdrawal. J Neurosci, v.15, n.12, Dec, p.8031-8. 1995.

Aley, K. O. e J. D. Levine. Multiple receptors involved in peripheral alpha 2, mu, and A1 antinociception, tolerance, and withdrawal. J Neurosci, v.17, n.2, Jan 15, p.735-44. 1997.

Appleton, I., A. H. Dickenson, *et al.* The pharmacology of pain. Berlin ; London: Springer. 1997. xxii,479p. p. (Handbook of experimental pharmacology, 0171-2004 ; v.130)

Aumeerally, N., G. Allen, *et al.* Glutamate-evoked release of adenosine and regulation of peripheral nociception. Neuroscience, v.127, n.1, p.1-11. 2004.

Aviado, D. M. Inosine : a naturally occurring cardiotonic agent. J Pharmacol, v.14 Suppl 3, p.47-71. 1983.

Barankiewicz, J. e A. Cohen. Purine nucleotide metabolism in resident and activated rat macrophages in vitro. Eur J Immunol, v.15, n.6, Jun, p.627-31. 1985.

Bastia, E., K. Varani, *et al.* Effects of A(1) and A(2A) adenosine receptor ligands in mouse acute models of pain. Neurosci Lett, v.328, n.3, Aug 16, p.241-4. 2002.

Beirith, A., A. R. Santos, *et al.* Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. Brain Res, v.924, n.2, Jan 11, p.219-28. 2002.

_____. The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibres in glutamate-induced nociception and paw oedema in mice. Brain Res, v.969, n.1-2, Apr 18, p.110-6. 2003.

Besson, J. M. The neurobiology of pain. Lancet, v.353, n.9164, May 8, p.1610-5. 1999.

Blum, D., R. Hourez, *et al.* Adenosine receptors and Huntington's disease: implications for pathogenesis and therapeutics. Lancet Neurol, v.2, n.6, Jun, p.366-74. 2003.

Boschi, G., M. Desiles, *et al.* Antinociceptive properties of thyrotropin releasing hormone in mice: comparison with morphine. Br J Pharmacol, v.79, n.1, May, p.85-92. 1983.

Brundege, J. M. e T. V. Dunwiddie. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. Adv Pharmacol, v.39, p.353-91. 1997.

Cahill, C. M., T. D. White, *et al.* Spinal opioid receptors and adenosine release: neurochemical and behavioral characterization of opioid subtypes. J Pharmacol Exp Ther, v.275, n.1, Oct, p.84-93. 1995.

Cassada, D. C., J. J. Gangemi, *et al.* Systemic adenosine A2A agonist ameliorates ischemic reperfusion injury in the rabbit spinal cord. Ann Thorac Surg, v.72, n.4, Oct, p.1245-50. 2001.

Cassada, D. C., C. G. Tribble, *et al.* Adenosine A2A agonist reduces paralysis after spinal cord ischemia: correlation with A2A receptor expression on motor neurons. Ann Thorac Surg, v.74, n.3, Sep, p.846-9; discussion 849-50. 2002.

Choca, J. I., R. D. Green, *et al.* Adenosine A1 and A2 receptors of the substantia gelatinosa are located predominantly on intrinsic neurons: an autoradiography study. J Pharmacol Exp Ther, v.247, n.2, Nov, p.757-64. 1988.

Chuaychoo, B., M. G. Lee, *et al.* Evidence for both adenosine A1 and A2A receptors activating single vagal sensory C-fibres in guinea pig lungs. J Physiol, v.575, n.Pt 2, Sep 1, p.481-90. 2006.

Coderre, T. J. e K. Yashpal. Intracellular messengers contributing to persistent nociception and hyperalgesia induced by L-glutamate and substance P in the rat formalin pain model. Eur J Neurosci, v.6, n.8, Aug 1, p.1328-34. 1994.

Coggeshall, R. E. e S. M. Carlton. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. Brain Res Brain Res Rev, v.24, n.1, Jun, p.28-66. 1997.

Costenla, A. R., A. De Mendonca, *et al.* An adenosine analogue inhibits NMDA receptor-mediated responses in bipolar cells of the rat retina. Exp Eye Res, v.68, n.3, Mar, p.367-70. 1999.

Da Silva Torres, I. L., C. D. Bonan, *et al.* Effect of drugs active at adenosine receptors upon chronic stress-induced hyperalgesia in rats. Eur J Pharmacol, v.481, n.2-3, Nov 28, p.197-201. 2003.

Daly, J. W., P. Butts-Lamb, *et al.* Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system: interaction with caffeine and related methylxanthines. Cell Mol Neurobiol, v.3, n.1, Mar, p.69-80. 1983.

Dart, C. e N. B. Standen. Adenosine-activated potassium current in smooth muscle cells isolated from the pig coronary artery. J Physiol, v.471, Nov, p.767-86. 1993.

De Souza, L. F., D. P. Gelain, *et al.* Extracellular inosine participates in tumor necrosis factor- α induced nitric oxide production in cultured Sertoli cells. Mol Cell Biochem, v.281, n.1-2, Jan, p.123-8. 2006.

Delander, G. E. e C. J. Hopkins. Spinal adenosine modulates descending antinociceptive pathways stimulated by morphine. J Pharmacol Exp Ther, v.239, n.1, Oct, p.88-93. 1986.

Doak, G. J. e J. Sawynok. Complex role of peripheral adenosine in the genesis of the response to subcutaneous formalin in the rat. Eur J Pharmacol, v.281, n.3, Aug 15, p.311-8. 1995.

Doi, T., S. Kuzuna, *et al.* Spinal antinociceptive effects of adenosine compounds in mice. Eur J Pharmacol, v.137, n.2-3, Jun 4, p.227-31. 1987.

Dunwiddie, T. V. e S. A. Masino. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. Annu Rev Neurosci, v.24, p.31-55. 2001.

Edwards, F. A. e S. J. Robertson. The function of A2 adenosine receptors in the mammalian brain: evidence for inhibition vs. enhancement of voltage gated calcium channels and neurotransmitter release. Prog Brain Res, v.120, p.265-73. 1999.

Feoktistov, I. e I. Biaggioni. Adenosine A2B receptors. Pharmacol Rev, v.49, n.4, Dec, p.381-402. 1997.

Fields, T. A. e P. J. Casey. Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins. Biochem J, v.321 (Pt 3), Feb 1, p.561-71. 1997.

Fredholm, B. B., I. J. Ap, *et al.* International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. Pharmacol Rev, v.53, n.4, Dec, p.527-52. 2001.

Fredholm, B. B., W. Proctor, *et al.* In vivo pertussis toxin treatment attenuates some, but not all, adenosine A1 effects in slices of the rat hippocampus. Eur J Pharmacol, v.172, n.3, Aug 15, p.249-62. 1989.

Fundytus, M. E. Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. CNS Drugs, v.15, n.1, Jan, p.29-58. 2001.

Fundytus, M. E., K. Yashpal, *et al.* Knockdown of spinal metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR(1)) alleviates pain and restores opioid efficacy after nerve injury in rats. Br J Pharmacol, v.132, n.1, Jan, p.354-67. 2001.

Garcia Soriano, F., L. Liaudet, *et al.* Inosine improves gut permeability and vascular reactivity in endotoxic shock. Crit Care Med, v.29, n.4, Apr, p.703-8. 2001.

Geiger, J. D., F. S. Labella, *et al.* Characterization and localization of adenosine receptors in rat spinal cord. J Neurosci, v.4, n.9, Sep, p.2303-10. 1984.

Gomez, G. e M. V. Sitkovsky. Differential requirement for A2a and A3 adenosine receptors for the protective effect of inosine in vivo. Blood, v.102, n.13, Dec 15, p.4472-8. 2003.

Goodman, R. R., M. J. Kuhar, *et al.* Adenosine receptors: autoradiographic evidence for their location on axon terminals of excitatory neurons. Science, v.220, n.4600, May 27, p.967-9. 1983.

Goodman, R. R. e S. H. Synder. Autoradiographic localization of adenosine receptors in rat brain using [3H]cyclohexyladenosine. J Neurosci, v.2, n.9, Sep, p.1230-41. 1982.

Guieu, R., J. C. Peragut, *et al.* Adenosine and neuropathic pain. Pain, v.68, n.2-3, Dec, p.271-4. 1996.

Haddad, J. J. On the enigma of pain and hyperalgesia: A molecular perspective. Biochem Biophys Res Commun, v.353, n.2, Feb 9, p.217-24. 2007.

Hammond, D. L. e M. A. Ruda. Developmental alterations in nociceptive threshold, immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance P, and fluoride-resistant acid phosphatase in neonatally capsaicin-treated rats. J Comp Neurol, v.312, n.3, Oct 15, p.436-50. 1991.

Handwerker, H. O., S. Kilo, *et al.* Unresponsive afferent nerve fibres in the sural nerve of the rat. J Physiol, v.435, Apr, p.229-42. 1991.

Hasko, G., D. G. Kuhel, *et al.* Adenosine inhibits IL-12 and TNF-[alpha] production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. Faseb J, v.14, n.13, Oct, p.2065-74. 2000.

Hasko, G., M. V. Sitkovsky, *et al.* Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. Trends Pharmacol Sci, v.25, n.3, Mar, p.152-7. 2004.

Hasuo, H., T. Matsuoka, *et al.* Activation of presynaptic 5-hydroxytryptamine 2A receptors facilitates excitatory synaptic transmission via protein kinase C in the dorsolateral septal nucleus. J Neurosci, v.22, n.17, Sep 1, p.7509-17. 2002.

Haynes, J. M. A(2A) adenosine receptor mediated potassium channel activation in rat epididymal smooth muscle. Br J Pharmacol, v.130, n.3, Jun, p.685-91. 2000.

Herrick-Davis, K., S. Chippari, *et al.* Evaluation of adenosine agonists as potential analgesics. Eur J Pharmacol, v.162, n.2, Mar 21, p.365-9. 1989.

Holmgren, M., J. Hedner, *et al.* Characterization of the antinociceptive effects of some adenosine analogues in the rat. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, v.334, n.3, Nov, p.290-3. 1986.

Holzer, P. Capsaicin as a tool for studying sensory neuron functions. Adv Exp Med Biol, v.298, p.3-16. 1991.

Hunskar, S. e K. Hole. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. Pain, v.30, n.1, Jul, p.103-14. 1987.

Hunt, S. P. e M. Koltzenburg. The neurobiology of pain : (molecular and cellular neurobiology). Oxford: Oxford University Press. 2005. ix, 403 p., [4] leaves of plates p. (Molecular and cellular neurobiology series)

Hunt, S. P. e P. W. Mantyh. The molecular dynamics of pain control. Nat Rev Neurosci, v.2, n.2, Feb, p.83-91. 2001.

Hussey, M. J., G. D. Clarke, *et al.* Reduced response to the formalin test and lowered spinal NMDA glutamate receptor binding in adenosine A2A receptor knockout mice. Pain, v.129, n.3, Jun, p.287-94. 2007.

Hylden, J. L. e G. L. Wilcox. Intrathecal morphine in mice: a new technique. Eur J Pharmacol, v.67, n.2-3, Oct 17, p.313-6. 1980.

Idzko, M., E. Panther, *et al.* Inosine stimulates chemotaxis, Ca²⁺-transients and actin polymerization in immature human dendritic cells via a pertussis toxin-sensitive mechanism independent of adenosine receptors. J Cell Physiol, v.199, n.1, Apr, p.149-56. 2004.

Ikeda, Y., A. Ueno, *et al.* Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. Life Sci, v.69, n.24, Nov 2, p.2911-9. 2001.

Jacobson, K. A. e Z. G. Gao. Adenosine receptors as therapeutic targets. Nat Rev Drug Discov, v.5, n.3, Mar, p.247-64. 2006.

Jin, X., R. K. Shepherd, *et al.* Inosine binds to A3 adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation. J Clin Invest, v.100, n.11, Dec 1, p.2849-57. 1997.

Jones, C. E., J. X. Thomas, Jr., *et al.* Positive inotropic response to inosine in the in situ canine heart. Am J Physiol, v.233, n.4, Oct, p.H438-43. 1977.

Juhasz-Nagy, A. e D. M. Aviado. Inosine as a cardiotonic agent that reverses adrenergic beta blockade. J Pharmacol Exp Ther, v.202, n.3, Sep, p.683-95. 1977.

Julius, D. e A. I. Basbaum. Molecular mechanisms of nociception. Nature, v.413, n.6852, Sep 13, p.203-10. 2001.

Karlsten, R., T. Gordh, *et al.* Local antinociceptive and hyperalgesic effects in the formalin test after peripheral administration of adenosine analogues in mice. Pharmacol Toxicol, v.70, n.6 Pt 1, Jun, p.434-8. 1992.

Kaster, M. P., A. O. Rosa, *et al.* Adenosine administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of A1 and A2A receptors. Neurosci Lett, v.355, n.1-2, Jan 23, p.21-4. 2004.

Keddie, J. R., S. M. Poucher, *et al.* In vivo characterisation of ZM 241385, a selective adenosine A2A receptor antagonist. Eur J Pharmacol, v.301, n.1-3, Apr 22, p.107-13. 1996.

Keil, G. J., 2nd e G. E. Delander. Spinally-mediated antinociception is induced in mice by an adenosine kinase-, but not by an adenosine deaminase-, inhibitor. Life Sci, v.51, n.19, p.PL171-6. 1992.

_____. Adenosine kinase and adenosine deaminase inhibition modulate spinal adenosine- and opioid agonist-induced antinociception in mice. Eur J Pharmacol, v.271, n.1, Dec 12, p.37-46. 1994.

_____. Time-dependent antinociceptive interactions between opioids and nucleoside transport inhibitors. J Pharmacol Exp Ther, v.274, n.3, Sep, p.1387-92. 1995.

Khandwala, H., Z. Zhang, *et al.* Inhibition of strychnine-allodynia is mediated by spinal adenosine A1- but not A2-receptors in the rat. Brain Res, v.808, n.1, Oct 12, p.106-9. 1998.

Kidd, B. L., A. Photiou, *et al.* The role of inflammatory mediators on nociception and pain in arthritis. Novartis Found Symp, v.260, p.122-33; discussion 133-8, 277-9. 2004.

Klinger, M., M. Freissmuth, *et al.* Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins. Cell Signal, v.14, n.2, Feb, p.99-108. 2002.

Knyihar, E. e B. Csillik. Plasticity of nociception: recent advances in function-oriented structural pain research. Ideggyogy Sz, v.59, n.3-4, Mar 20, p.87-97. 2006.

Koster, R. Anderson, M . Beer, E.J. Acetic acid for analgesic screening, *Fed Proc* **18** (1959), p. 412.

Lappas, C. M., G. W. Sullivan, *et al.* Adenosine A2A agonists in development for the treatment of inflammation. Expert Opin Investig Drugs, v.14, n.7, Jul, p.797-806. 2005.

Latini, S., M. Pazzagli, *et al.* A2 adenosine receptors: their presence and neuromodulatory role in the central nervous system. Gen Pharmacol, v.27, n.6, Sep, p.925-33. 1996.

Latini, S. e F. Pedata. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. J Neurochem, v.79, n.3, Nov, p.463-84. 2001.

Laursen, S. E. e J. K. Belknap. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. J Pharmacol Methods, v.16, n.4, Dec, p.355-7. 1986.

Le Bars, D., M. Gozariu, *et al.* Animal models of nociception. Pharmacol Rev, v.53, n.4, Dec, p.597-652. 2001.

Ledent, C., J. M. Vaugeois, *et al.* Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. Nature, v.388, n.6643, Aug 14, p.674-8. 1997.

Lee, Y. W. e T. L. Yaksh. Pharmacology of the spinal adenosine receptor which mediates the antiallodynic action of intrathecal adenosine agonists. J Pharmacol Exp Ther, v.277, n.3, Jun, p.1642-8. 1996.

Liaudet, L., J. G. Mabley, *et al.* Inosine exerts a broad range of antiinflammatory effects in a murine model of acute lung injury. Ann Surg, v.235, n.4, Apr, p.568-78. 2002.

_____. Inosine reduces systemic inflammation and improves survival in septic shock induced by cecal ligation and puncture. Am J Respir Crit Care Med, v.164, n.7, Oct 1, p.1213-20. 2001.

Liu, X. J., T. D. White, *et al.* Involvement of primary sensory afferents, postganglionic sympathetic nerves and mast cells in the formalin-evoked peripheral release of adenosine. Eur J Pharmacol, v.429, n.1-3, Oct 19, p.147-55. 2001.

_____. Intraplantar injection of glutamate evokes peripheral adenosine release in the rat hind paw: involvement of peripheral ionotropic glutamate receptors and capsaicin-sensitive sensory afferents. J Neurochem, v.80, n.4, Feb, p.562-70. 2002.

Loeser, J. D. e R. Melzack. Pain: an overview. Lancet, v.353, n.9164, May 8, p.1607-9. 1999.

Londos, C., D. M. Cooper, *et al.* Subclasses of external adenosine receptors. Proc Natl Acad Sci U S A, v.77, n.5, May, p.2551-4. 1980.

Lutfy, K., S. X. Cai, *et al.* Antinociceptive effects of NMDA and non-NMDA receptor antagonists in the tail flick test in mice. Pain, v.70, n.1, Mar, p.31-40. 1997.

Mabley, J. G., P. Pacher, *et al.* Inosine reduces inflammation and improves survival in a murine model of colitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, v.284, n.1, Jan, p.G138-44. 2003.

Macdonald, R. L., J. H. Skerritt, *et al.* Adenosine agonists reduce voltage-dependent calcium conductance of mouse sensory neurones in cell culture. J Physiol, v.370, Jan, p.75-90. 1986.

Malmberg, A. B. e T. L. Yaksh. Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. J Pharmacol Exp Ther, v.263, n.1, Oct, p.136-46. 1992.

Marala, R. B. e S. J. Mustafa. Adenosine A1 receptor-induced upregulation of protein kinase C: role of pertussis toxin-sensitive G protein(s). Am J Physiol, v.269, n.5 Pt 2, Nov, p.H1619-24. 1995a.

_____. Modulation of protein kinase C by adenosine: involvement of adenosine A1 receptor-pertussis toxin sensitive nucleotide binding protein system. Mol Cell Biochem, v.149-150, Aug-Sep, p.51-8. 1995b.

- Marton, A., P. Pacher, *et al.* Anti-inflammatory effects of inosine in human monocytes, neutrophils and epithelial cells in vitro. Int J Mol Med, v.8, n.6, Dec, p.617-21. 2001.
- Mcadoo, D. J., G. Robak, *et al.* Adenosine release upon spinal cord injury. Brain Res, v.854, n.1-2, Jan 31, p.152-7. 2000.
- Mccall, W. D., K. D. Tanner, *et al.* Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. Neurosci Lett, v.208, n.1, Apr 12, p.45-8. 1996.
- Melzack, R. From the gate to the neuromatrix. Pain, v.Suppl 6, Aug, p.S121-6. 1999.
- Meotti, F. C., R. Fachinetto, *et al.* Antinociceptive action of myricitrin: involvement of the K⁺ and Ca²⁺ channels. Eur J Pharmacol, v.567, n.3, Jul 19, p.198-205. 2007.
- Meyer, R. A., K. D. Davis, *et al.* Mechanically insensitive afferents (MIAs) in cutaneous nerves of monkey. Brain Res, v.561, n.2, Oct 11, p.252-61. 1991.
- Millan, M. J. Serotonin and pain: evidence that activation of 5-HT_{1A} receptors does not elicit antinociception against noxious thermal, mechanical and chemical stimuli in mice. Pain, v.58, n.1, Jul, p.45-61. 1994.
- _____. The induction of pain: an integrative review. Prog Neurobiol, v.57, n.1, Jan, p.1-164. 1999.
- Miranda, H. F. e G. Pinardi. Antinociception, tolerance, and physical dependence comparison between morphine and tramadol. Pharmacol Biochem Behav, v.61, n.4, Dec, p.357-60. 1998.
- Nakamura, I., Y. Ohta, *et al.* Characterization of adenosine receptors mediating spinal sensory transmission related to nociceptive information in the rat. Anesthesiology, v.87, n.3, Sep, p.577-84. 1997.
- Neugebauer, V. Metabotropic glutamate receptors--important modulators of nociception and pain behavior. Pain, v.98, n.1-2, Jul, p.1-8. 2002.
- Norenberg, W., K. Wirkner, *et al.* Effect of adenosine and some of its structural analogues on the conductance of NMDA receptor channels in a subset of rat neostriatal neurones. Br J Pharmacol, v.122, n.1, Sep, p.71-80. 1997.
- Ongini, E. e B. B. Fredholm. Pharmacology of adenosine A_{2A} receptors. Trends Pharmacol Sci, v.17, n.10, Oct, p.364-72. 1996.
- Ozawa, S., H. Kamiya, *et al.* Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. Prog Neurobiol, v.54, n.5, Apr, p.581-618. 1998.
- Patel, M. K., R. D. Pinnock, *et al.* Adenosine exerts multiple effects in dorsal horn neurones of the adult rat spinal cord. Brain Res, v.920, n.1-2, Nov 30, p.19-26. 2001.

- Pechlivanova, D. M. e V. P. Georgiev. Interaction of angiotensin II and adenosine A1 and A2A receptor ligands on the writhing test in mice. Pharmacol Biochem Behav, v.72, n.1-2, May, p.23-8. 2002.
- Pertwee, R. G. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. Curr Med Chem, v.6, n.8, Aug, p.635-64. 1999.
- Pleuvry, B. J. e G. R. Lauretti. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. Pharmacol Ther, v.71, n.3, p.313-24. 1996.
- Poon, A. e J. Sawynok. Antinociception by adenosine analogs and inhibitors of adenosine metabolism in an inflammatory thermal hyperalgesia model in the rat. Pain, v.74, n.2-3, Feb, p.235-45. 1998.
- Prior, H. M., M. S. Yates, *et al.* Role of K⁺ channels in A2A adenosine receptor-mediated dilation of the pressurized renal arcuate artery. Br J Pharmacol, v.126, n.2, Jan, p.494-500. 1999.
- Puig, S. e L. S. Sorkin. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. Pain, v.64, n.2, Feb, p.345-55. 1996.
- Ralevic, V. e G. Burnstock. Effects of purines and pyrimidines on the rat mesenteric arterial bed. Circ Res, v.69, n.6, Dec, p.1583-90. 1991.
- _____. Receptors for purines and pyrimidines. Pharmacol Rev, v.50, n.3, Sep, p.413-92. 1998.
- Regaya, I., T. Pham, *et al.* Small conductance calcium-activated K⁺ channels, SkCa, but not voltage-gated K⁺ (Kv) channels, are implicated in the antinociception induced by CGS21680, a A2A adenosine receptor agonist. Life Sci, v.76, n.4, Dec 10, p.367-77. 2004.
- Ribeiro, J. A., A. M. Sebastiao, *et al.* Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. Prog Neurobiol, v.68, n.6, Dec, p.377-92. 2002.
- Ribeiro, R. A., M. L. Vale, *et al.* Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. Eur J Pharmacol, v.387, n.1, Jan 3, p.111-8. 2000.
- Riedel, W. e G. Neeck. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. Z Rheumatol, v.60, n.6, Dec, p.404-15. 2001.
- Rodrigues, A. L., G. L. Da Silva, *et al.* Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. Life Sci, v.70, n.12, Feb 8, p.1347-58. 2002.
- Rogel, A., Y. Bromberg, *et al.* The neuroprotective adenosine-activated signal transduction pathway involves activation of phospholipase C. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, v.25, n.9-11, p.1283-6. 2006.

Rosenberg, P. A. e Y. Li. Adenylyl cyclase activation underlies intracellular cyclic AMP accumulation, cyclic AMP transport, and extracellular adenosine accumulation evoked by beta-adrenergic receptor stimulation in mixed cultures of neurons and astrocytes derived from rat cerebral cortex. Brain Res, v.692, n.1-2, Sep 18, p.227-32. 1995.

Sala-Newby, G. B., A. C. Skladanowski, *et al.* The mechanism of adenosine formation in cells. Cloning of cytosolic 5'-nucleotidase-I. J Biol Chem, v.274, n.25, Jun 18, p.17789-93. 1999.

Salter, M. W., Y. De Koninck, *et al.* Physiological roles for adenosine and ATP in synaptic transmission in the spinal dorsal horn. Prog Neurobiol, v.41, n.2, Aug, p.125-56. 1993.

Sandner-Kiesling, A., X. Li, *et al.* Morphine-induced spinal release of adenosine is reduced in neuropathic rats. Anesthesiology, v.95, n.6, Dec, p.1455-9. 2001.

Santicioli, P., E. Del Bianco, *et al.* Adenosine inhibits action potential-dependent release of calcitonin gene-related peptide- and substance P-like immunoreactivities from primary afferents in rat spinal cord. Neurosci Lett, v.144, n.1-2, Sep 14, p.211-4. 1992.

Santos, A. R. e J. B. Calixto. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. Neuropeptides, v.31, n.4, Aug, p.381-9. 1997.

Santos, A. R., R. O. De Campos, *et al.* The involvement of K⁺ channels and Gi/o protein in the antinociceptive action of the gallic acid ethyl ester. Eur J Pharmacol, v.379, n.1, Aug 20, p.7-17. 1999.

Santos, A. R., V. M. Gadotti, *et al.* Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. Neuropharmacology, v.48, n.7, Jun, p.1021-34. 2005.

Santos, A. R., O. G. Miguel, *et al.* Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-N-propyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. J Pharmacol Exp Ther, v.289, n.1, Apr, p.417-26. 1999.

Savinainen, J. R. e J. T. Laitinen. Detection of cannabinoid CB1, adenosine A1, muscarinic acetylcholine, and GABA(B) receptor-dependent G protein activity in transducin-deactivated membranes and autoradiography sections of rat retina. Cell Mol Neurobiol, v.24, n.2, Apr, p.243-56. 2004.

Sawynok, J. Adenosine receptor activation and nociception. Eur J Pharmacol, v.347, n.1, Apr 17, p.1-11. 1998.

_____. Adenosine and ATP receptors. Handb Exp Pharmacol, n.177, p.309-28. 2007.

Sawynok, J. e X. J. Liu. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. Prog Neurobiol, v.69, n.5, Apr, p.313-40. 2003.

Sawynok, J. e A. Reid. Peripheral adenosine 5'-triphosphate enhances nociception in the formalin test via activation of a purinergic p2X receptor. Eur J Pharmacol, v.330, n.2-3, Jul 9, p.115-21. 1997.

Sawynok, J., A. R. Reid, *et al.* Peripheral antinociceptive action of amitriptyline in the rat formalin test: involvement of adenosine. Pain, v.80, n.1-2, Mar, p.45-55. 1999.

Schulte, G., B. Robertson, *et al.* Distribution of antinociceptive adenosine A1 receptors in the spinal cord dorsal horn, and relationship to primary afferents and neuronal subpopulations. Neuroscience, v.121, n.4, p.907-16. 2003.

Schultz, J. E. e G. J. Gross. Opioids and cardioprotection. Pharmacol Ther, v.89, n.2, Feb, p.123-37. 2001.

Seesko, R. C. e H. G. Zimmer. Hemodynamic effects of inosine in combination with positive and negative inotropic drugs: studies on rats in vivo. J Cardiovasc Pharmacol, v.16, n.2, Aug, p.249-56. 1990.

Seguin, L., S. Le Marouille-Girardon, *et al.* Antinociceptive profiles of non-peptidergic neurokinin1 and neurokinin2 receptor antagonists: a comparison to other classes of antinociceptive agent. Pain, v.61, n.2, May, p.325-43. 1995.

Shibasaki, H. Central mechanisms of pain perception. Suppl Clin Neurophysiol, v.57, p.39-49. 2004.

Sperlagh, B., G. Zsilla, *et al.* K(ATP) channel blockers selectively interact with A(1)-adenosine receptor mediated modulation of acetylcholine release in the rat hippocampus. Brain Res, v.889, n.1-2, Jan 19, p.63-70. 2001.

Taiwo, Y. O. e J. D. Levine. Direct cutaneous hyperalgesia induced by adenosine. Neuroscience, v.38, n.3, p.757-62. 1990.

Takahashi, R. N., F. A. Pamplona, *et al.* Adenosine receptor antagonists for cognitive dysfunction: a review of animal studies. Front Biosci, v.13, p.2614-32. 2008.

Tjolsen, A., O. G. Berge, *et al.* The formalin test: an evaluation of the method. Pain, v.51, n.1, Oct, p.5-17. 1992.

Van Calker, D., M. Muller, *et al.* Adenosine inhibits the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. Nature, v.276, n.5690, Dec 21-28, p.839-41. 1978.

_____. Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. J Neurochem, v.33, n.5, Nov, p.999-1005. 1979.

Van Der Ploeg, I., N. Altiok, *et al.* Role of a pertussis toxin sensitive G-protein in mediating the effects of phorbol esters on receptor activated cyclic AMP accumulation in Jurkat cells. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, v.344, n.5, Nov, p.611-7. 1991.

Wall, P. D. e R. Melzack. Textbook of pain. Edinburgh: Churchill Livingstone. 1999. 1152p. p.

Wiech, K., R. T. Kiefer, *et al.* A placebo-controlled randomized crossover trial of the N-methyl-D-aspartic acid receptor antagonist, memantine, in patients with chronic phantom limb pain. Anesth Analg, v.98, n.2, Feb, p.408-13, table of contents. 2004.

Wirkner, K., H. Assmann, *et al.* Inhibition by adenosine A(2A) receptors of NMDA but not AMPA currents in rat neostriatal neurons. Br J Pharmacol, v.130, n.2, May, p.259-69. 2000.

Woolf, C. J. An overview of the mechanisms of hyperalgesia. Pulm Pharmacol, v.8, n.4-5, Aug-Oct, p.161-7. 1995.

Wu, W. P., J. X. Hao, *et al.* Increased nociceptive response in mice lacking the adenosine A1 receptor. Pain, v.113, n.3, Feb, p.395-404. 2005.

Yaksh, T. L. Regulation of spinal nociceptive processing: where we went when we wandered onto the path marked by the gate. Pain, v.Suppl 6, Aug, p.S149-52. 1999.

Yoon, M. H., H. B. Bae, *et al.* Antinociception of intrathecal adenosine receptor subtype agonists in rat formalin test. Anesth Analg, v.101, n.5, Nov, p.1417-21. 2005.

Zahn, P. K., H. Straub, *et al.* Adenosine A1 but not A2a receptor agonist reduces hyperalgesia caused by a surgical incision in rats: a pertussis toxin-sensitive G protein-dependent process. Anesthesiology, v.107, n.5, Nov, p.797-806. 2007.

Zarrindast, M. R., H. Matinrokh, *et al.* Adenosine receptor agonists or antagonists alter antinociception, but did not show an interaction with imipramine-induced antinociception in the formalin test in mice. Eur Neuropsychopharmacol, v.13, n.3, May, p.165-72. 2003.

Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain, v.16, n.2, Jun, p.109-10. 1983.

9. ANEXOS

Tabela 2. Valores de DI_{50} e inibições da inosina, adenosina e fármacos referências para tratamento da dor.

Fármaco	Modelo	Via	DI_{50} (int. de confiança)	Inib (%)
Inosina	Ácido Acético	i.p.	1,96 (0,64-5,99)	86±6
Inosina	Ácido Acético	v.o.	139,7 (105,90-164,09)	69±5
Inosina	Ácido Acético	i.t.	4,19 (3,50-5,00)	72 ± 5
Inosina	Ácido Acético	i.c.v.	0,27 (0,21-0,34)	56 ± 6
Adenosina	Ácido Acético	i.p.	25,12 (15,58 - 33,31)	91 ± 12
Inosina	Formalina F1	i.p.	NA	NA
Inosina	Formalina F2	i.p.	6,4 (5,41-7,50)	96±2
Inosina	Glutamato	i.p.	0,60 (0,41-0,87)	69±5
Inosina	Glutamato	i.pl.	12,35 (6,87-18,32)	56±7
Morfina	Ácido Acético	s.c.	0,56 (0,29-1,11)	100 *
Indometacina	Ácido Acético	i.p.	0,23 (0,06-0,75)	100*
Morfina	Formalina F2	s.c.	0,4 (0,1-0,9)	100**
Indometacina	Formalina F2	i.p.	3 (0,5-18,1)	79**
Morfina	Ácido Acético	s.c.	0,21 (0,13 – 0,29)	NA***
Morfina	Ácido Acético	s.c.	0,2 (0,15 – 0,27)	NA****

* (Millan, 1994) ** (Seguin, Le Marouille-Girardon *et al.*, 1995) *** (Miranda e Pinardi, 1998) **** (Boschi, Desiles *et al.*, 1983).

As diferentes doses de inosina administradas por várias vias para causar efeito antinociceptivo em modelos distintos, fornecem diferentes valores de DI_{50} (ver tabela abaixo). A comparação entre estes valores é interessante porque pode sugerir efeitos farmacocinéticos e indicar melhores vias e/ou modelos para posteriores estudos com a inosina. Além disso, a tabela 2 traz dados com fármacos utilizados clinicamente no tratamento da dor, e suas

respectivas DI_{50} e porcentagem de inibição em modelos animais de nocicepção.